

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ISABELLA BITTENCOURT DO VALLE**

**EXPRESSÃO DE P63 E  $\Delta$ NP63 COMO POTENCIAIS  
BIOMARCADORES DE PROGRESSÃO TUMORAL E PROGNÓSTICO  
EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

VITÓRIA

2018

**ISABELLA BITTENCOURT DO VALLE**

**EXPRESSÃO DE P63 E  $\Delta$ NP63 COMO POTENCIAIS  
BIOMARCADORES DE PROGRESSÃO TUMORAL E PROGNÓSTICO  
EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Ventrin von Zeidler

VITÓRIA  
2018

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, à Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) por fomentar e viabilizar a execução desta pesquisa.

## DEDICATÓRIA

Agradeço à minha orientadora Sandra, por todos esses anos de parceria. Obrigada por tantos ensinamentos, pelo excelente trabalho que desempenha como professora, pesquisadora, orientadora e pela sua amizade.

Dedico este trabalho à minha mãe, que suporta todas as minhas decisões e é minha grande referência. Ao meu namorado João Marcus, pela parceria, pelas ajudas durante a revisão do trabalho e nas análises estatísticas, por acreditar no meu potencial e sonhar meus sonhos junto comigo.

À família Laboratório de Patologia Molecular, agradeço muito por cada ombro amigo, cada ensinamento, por abraçarem o problema do outro como se fossem seus, pelo companheirismo até tarde da noite nas imunos, nas estatísticas, nos dias de ambulatório, pela companhia nos congressos e em muitos outros momentos incríveis juntos. Nada neste trabalho, nem do que aprendi no mestrado foi feito integralmente por mim e é clara a participação de vocês em cada parte dele. Obrigada principalmente: Priscila, Paola, Anna Clara, Thabata, Jéssica, Vinicius, e Willene.

À minha amiga querida Gisele, aos maravilhosos momentos que passamos juntas, pela parceria inesgotável, você é um presente que a Biotecnologia me deu.

À professora Fernanda Peres, que com maestria me impulsionou nos conhecimentos de estatística.

Agradeço ao Hospital Santa Rita de Cássia, ao Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes e a toda equipe que possibilitou a execução deste trabalho, principalmente ao Dr. José Roberto Podestá e sua equipe, que acompanhei por muitas quintas-feiras.

## RESUMO

O prognóstico de pacientes com Carcinoma Epidermóide Oral (CEO) é majoritariamente desfavorável, principalmente devido à elevada taxa de recidiva e mortalidade. Até o momento, não existem marcadores biológicos clinicamente disponíveis que indiquem eventos de transformação tumoral ou prognóstico em CEO. Portanto, grande interesse tem sido direcionado aos genes reguladores do ciclo celular, como a participação da expressão gênica de P63 na oncogênese através da sua atividade na regulação da proliferação e diferenciação celular em CEO. Este trabalho teve como objetivo analisar a aplicabilidade de p63 como biomarcador de prognóstico e progressão tumoral. Realizou-se estudo multicêntrico internacional, no qual foram obtidas amostras biológicas, dados clínicos e seguimento clínico de 109 indivíduos com CEO provenientes do Brasil e Reino Unido. As lâminas histológicas obtidas foram avaliadas quanto à gradação tumoral, infiltrado linfocitário tumoral (TIL), padrão de invasão tumoral e invasão perineural, vascular e linfática. *Tissue Microarray* (TMA) foi construído considerando 3 áreas: epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor. Os TMAs foram submedidos à imunohistoquímica para análise de expressão de p63 e p40 ( $\Delta Np63$ ) e hibridização *in situ* de RNA para investigar p63 mRNA. Para avaliar a expressão de p63 e p40 foi considerada a marcação nuclear em queratinócitos através de *H-Score*. A avaliação de p63 mRNA se deu por um guia de pontuação (*score* 0-4) conforme a quantidade de pontos em cada célula. O nível de significância considerado para todos os testes estatísticos foi de 95%. Teste Qui-Quadrado foi empregado para instituir associações entre as variáveis clínico-patológicas estudadas. A comparação entre a expressão da proteína p63, p40 e de p63 mRNA nas diferentes regiões foi realizada através do teste de Wilcoxon. Curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença foram obtidas pelo modelo de Kaplan-Meier e regressão de Cox. Nossos resultados mostraram associação entre a elevada presença de TIL no tumor com estadiamentos iniciais ( $p=0,001$ ) enquanto tabagismo mostrou relação com menor TIL ( $p=0,044$ ) e padrões de invasão tumoral dos tipos III e IV ( $p=0,032$ ). Indivíduos etilistas/ex-etilistas apresentaram mais invasão vascular que os não etilistas ( $p=0,015$ ). A expressão de p63 nos tumores foi maior que nas displasias ( $p=0,001$ ) e foi associada a tumores maiores (T3 e T4) ( $p=0,001$ ). Foi observada diferença quanto à expressão de p40 entre displasia e tumor ( $p<0,001$ ) e

displasias de alto risco apresentaram alta expressão de p40 ( $p=0,022$ ). A elevada expressão de p40 tumoral mostrou associação com tumores pouco diferenciados ( $p=0,010$ ) e com invasão de vasos linfáticos ( $p=0,022$ ). Não foi observada diferença de expressão de p63 mRNA entre as regiões estudadas. Indivíduos com estadios iniciais ( $p=0,001$ ) e não tabagistas ( $p=0,035$ ) tiveram maior sobrevida global. Mostraram pior sobrevida livre de doença indivíduos cujos padrões de invasão tumoral eram III e IV ( $p=0,014$ ) e que apresentavam tumores maiores ( $p=0,004$ ). Concluímos com este estudo que a expressão de p63, de p40, são úteis como marcadores de progressão tumoral, mas não comportam-se como bons marcadores de prognóstico uma vez que não mostraram influenciar os índices de sobrevida global e sobrevida livre de doença.

Palavras-Chave: Carcinoma epidermóide oral, p63, p40, imunohistoquímica

## ABSTRACT

The prognosis of patients with Oral Epidermoid Carcinoma (CEO) is mostly unfavorable, mainly due to the high rate of relapse and mortality. To date, there are no clinically available biological markers that indicate events of tumor transformation or prognosis in CEO. Therefore, interest has been shown into the cell cycle regulatory genes, such as the participation of P63 gene expression in oncogenesis through its activity in the regulation of cell proliferation and differentiation in CEO. This work aimed to analyze the applicability of p63 as a biomarker of prognosis and tumor progression. A multi-centered international study was carried out, in which biological samples, clinical data and clinical follow-up of 109 individuals with CEOs from Brazil and the United Kingdom were obtained. The histological slides obtained were evaluated for tumor grading, tumor lymphocyte infiltrate (TIL), tumor invasion pattern and perineural, vascular and lymphatic invasion. Tissue Microarray (TMA) was constructed considering 3 areas: epithelium adjacent to the tumor, dysplasia and tumor. The TMAs were submitted to immunohistochemistry for analysis of p63 and p40 ( $\Delta$ Np63) expression and in situ hybridization of RNA to investigate p63 mRNA. To evaluate the expression of p63 and p40, nuclear labeling in keratinocytes was considered by H-Score method. The evaluation of p63 mRNA was given by a scoring guide (score 0-4) according to the number of points in each cell. The level of significance considered for all statistical tests was 95%. Chi-square test was used to establish associations between the clinical-pathological variables studied. The comparison between p63, p40 and p63 mRNA protein expression in the different regions was performed by the Wilcoxon test. Overall survival and disease-free survival curves were obtained using the Kaplan-Meier model and Cox regression. Our results showed an association between the high TIL presence in the tumor with initial stages ( $p=0.001$ ) and smoking ( $p=0.044$ ) and tumor patterns of invasion types III and IV ( $p=0.032$ ). Subjects alcoholic/ex-alcoholic had more vascular invasion than non-alcoholics ( $p=0.015$ ). Expression of p63 in tumors was greater than in dysplasias ( $p=0.001$ ) and was associated with larger tumors (T3 and T4) ( $p=0.001$ ). Differences were observed in p40 expression between dysplasia and tumor ( $p<0.001$ ) and high risk dysplasias presented high expression of p40 ( $p=0.022$ ). The high expression of tumor p40 showed association with poorly differentiated tumors ( $p=0.010$ ) and invasion of lymphatic vessels ( $p=0.022$ ). No

difference in expression of p63 mRNA was observed between the regions studied. Individuals with early stages ( $p=0.001$ ) and non-smokers ( $p=0.035$ ) had greater overall survival. Patients whose tumor invasion patterns were III and IV ( $p=0.014$ ) and had larger tumors ( $p=0.004$ ) had worse disease-free survival. We conclude from this study that p63 and 40 expression are useful markers of tumor progression but do not behave as good prognostic markers since they have not been shown to influence overall survival and disease-free survival rates.

Key words: Oral epidermoid carcinoma, p63, p40, immunohistochemistry



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Seleção de subpopulações de células tumorais durante a progressão tumoral, recorrência e metástase. Fonte: Modificado de RAPISUWON; VIETSCH; WELLSTEIN, 2016. ....	22
<b>Figura 2</b> - Esquema estrutural de P63. Fonte: GONFLONI; CAPUTO; IANNIZZOTTO, 2015. ....	24
<b>Figura 3</b> - $\Delta$ Np63 $\alpha$ promove a proliferação celular através da inibição da atividade de GSK3 $\beta$ que ocorre por meio da inibição da proteína fosfatase PP2A. Fonte: Modificado de GUO; MILLS, 2007. ....	28
<b>Figura 4</b> - P53 mutante e seus efeitos em p63. Fonte: Modificado de FERRAIUOLO et al., 2016. ....	29
<b>Figura 5</b> - Modelo de participação de $\Delta$ Np63 na auto-renovação das células-tronco epiteliais. Fonte: Modificado de MELINO et al, 2015. ....	31
<b>Figura 6</b> - p63 controla as vias de sinalização Hh, WNT e Notch que participam do desenvolvimento e manutenção de células-tronco. Fonte: Modificado de MELINO et al., 2015. ....	33
<b>Figura 7</b> - Relação entre p63 e Notch. Fonte: Modificado de DOTTO, 2009. ....	35
<b>Figura 8</b> - A interação entre fatores de risco favorece um ambiente de instabilidade genômica. Fonte: Modificado de RIVERA, 2015. ....	38
<b>Figura 9</b> – Hibridização por RNAscope® requer ligação de duas sondas Z. Fonte: ACDBiotechne. ....	47
<b>Figura 10</b> – Fotomicrografia representativa da gradação tumoral em CEO, seguindo os critérios da OMS. ....	54
<b>Figura 11</b> – Fotomicrografia ilustrativa do padrão de infiltração linfocitária tumoral em CEO. ....	55
<b>Figura 12</b> – Fotomicrografia de CEO representando o padrão de invasão tumoral conforme proposto por Bryne et al 1992. ....	56
<b>Figura 13</b> – Fotomicrografia mostrando os diferentes tipos de invasão tumoral. (. ...	57
<b>Figura 14</b> – Expressão de p63 em CEO. (A, B) Imunomarcação de intensidade forte nas camadas basal e para-basal de epitélio adjacente ao tumor; (C, D) Imunomarcação de intensidade forte em displasia de baixo risco; (E) Controle positivo	

tonsila; (F) Controle negativo tonsila, omissão do anticorpo primário. Magnificações originais de 100x (A, C) e 400x (B, D, E, F). .....	62
<b>Figura 15</b> - Expressão de p63 em epitélio adjacente ao tumor e displasia.....	63
<b>Figura 16</b> - Expressão de p40 em CEO.....	69
<b>Figura 17</b> - Expressão de p40 em epitélio adjacente ao tumor e displasia.....	70
<b>Figura 18</b> - Expressão de p63 mRNA em epitélio adjacente ao tumor e displasia ...	75
<b>Figura 19</b> - Expressão de p63 mRNA em CEO .....	76
<b>Figura 20</b> - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação ao tamanho do tumor primário ( $p<0,001$ ). .....	81
<b>Figura 21</b> - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação à metástase em linfonodos regionais ( $p=0,007$ ). .....	82
<b>Figura 22</b> - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação ao estadió clínico ( $p=0,001$ ). .....	82
<b>Figura 23</b> - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação ao tabagismo ( $p=0,035$ ). .....	83
<b>Figura 24</b> - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação à expressão de p63 ( $p=0,069$ ). .....	84
<b>Figura 25</b> - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação à expressão de p40 ( $p=0,781$ ). .....	84
<b>Figura 26</b> - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação à expressão de p63 mRNA ( $p=0,885$ ). .....	85
<b>Figura 27</b> – Modelo de riscos proporcionais. Risco à evolução ao óbito em relação à metástase em linfonodos regionais ( $p=0,009$ ). .....	86
<b>Figura 28</b> - Curva de sobrevida livre de doença pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida livre de doença em relação ao padrão de invasão ( $p=0,014$ ). .....	87
<b>Figura 29</b> - Curva de sobrevida livre de doença pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida livre de doença em relação ao tamanho do tumor primário ( $p=0,004$ ). ....	87
<b>Figura 30</b> - Curva de sobrevida livre de doença pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida livre de doença em relação à expressão de p63 ( $p=0,188$ ). .....	88
<b>Figura 31</b> - Curva de sobrevida livre de doença pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida livre de doença em relação à expressão de p40 ( $p=0,953$ ). .....	88
<b>Figura 32</b> - Curva de sobrevida livre de doença pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida livre de doença em relação à expressão de p63 mRNA ( $p=0,988$ ). .....	89

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Características clínico-patológicas dos indivíduos com CEO (n=109).....	53
<b>Tabela 2</b> – Associação entre as variáveis: gradação tumoral, infiltração linfocitária tumoral, padrão de invasão, invasão linfática, vascular e perineural com as características clínico-patológicas dos indivíduos acometidos por CEO. ....	59
<b>Tabela 3</b> - Expressão de p63 em epitélio adjacente ao tumor, displasia e tecido tumoral. ....	61
<b>Tabela 4</b> – Associação entre expressão de p63 e grau de displasia (n=44).....	64
<b>Tabela 5</b> - Expressão de p63 e a progressão tumoral. Análise entre os pares de segmentos epitélio adjacente ao tumor/displasia, displasia/tumor e epitélio e tumor. ....	64
<b>Tabela 6</b> – Associação entre a expressão de p63 e as variáveis clínico-patológicas (n=109).....	65
<b>Tabela 7</b> - Associações entre a expressão de p63 e as variáveis histopatológicas (n=109).....	66
<b>Tabela 8</b> - Expressão de p40 em epitélio normal, displasia e tecido tumoral. ....	67
<b>Tabela 9</b> - Comparação entre a expressão de p40 entre os pares de segmentos epitélio/displasia, displasia/tumor e epitélio/tumor.....	67
<b>Tabela 10</b> – Associação entre expressão de p40 e o grau de displasia (n=39).....	68
<b>Tabela 11</b> - Associações entre a expressão de p40 e as variáveis clínico-patológicas (n=109).....	71
<b>Tabela 12</b> - Associações entre a expressão de p40 e as variáveis histopatológicas (n=109).....	72
<b>Tabela 13</b> - Expressão de p63 mRNA em epitélio normal, displasia e tecido tumoral. ....	73
<b>Tabela 14</b> - Comparação entre a expressão de p63 mRNA entre os pares de segmentos epitélio/displasia, displasia/tumor e epitélio/tumor. ....	73
<b>Tabela 15</b> - Associação entre expressão de p63 mRNA e o grau de displasia. ....	74
<b>Tabela 16</b> - Associações entre a expressão de p63 mRNA e as variáveis clínico-patológicas (n=109).....	77

<b>Tabela 17</b> - Associações entre a expressão de p63 mRNA e as variáveis histopatológicas (n=109). .....	78
<b>Tabela 18</b> – Frequência de expressão de p63, p40 e p63 mRNA em epitélio normal, displasia e tecido tumoral (n=109).....	79
<b>Tabela 19</b> – Análise de concordância Kappa entre as expressões de p63 e p40.....	80
<b>Tabela 20</b> – Comparação entre a expressão de p63 e p40 nas diferentes regiões estudadas.....	80
<b>Tabela 21</b> - Análise regressiva multivariada da sobrevida livre de doença.....	85

## LISTA DE SIGLAS

AMP - Amplificador

BSA – Albumina do soro bovino

CEO – Carcinoma epidermóide oral

CID – Classificação internacional de doenças

DAB – 3.3'-Diaminobenzidina

DBD – Domínio de ligação do DNA

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

HE – Hematoxilina-eosina

Hh – Hedgehg

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

IHQ – Imunohistoquímica

IRF – Fatores responsivos à interferons

SLD – Sobrevida livre de doença

N0 – Ausência de metástase em linfonodos regionais

N+ – Presença de metástase em linfonodos regionais

Nf-Kb – Fator nuclear Kb

OD – Domínio de oligomerização

P40 – isoforma  $\Delta$ Np63

P63 – proteína tumoral 63

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PTCH – Receptores Patched

RNA – Ácido ribonucleico

SAM – domínio alfa esterelizado

SG – Sobrevida global

T1 – Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão

T2 – Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão

T3 – Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão

T4 – Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face

TA – Domínio de transativação

TEM – Transição epitélio-mesênquima

TID – Domínio de inibição de oligomerização

TIL – Linfócitos T infiltrantes

TMA – Tissue microarray

TMN – Tumor Node Metastasis

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	19
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	21
2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL	21
2.2 TP63	23
2.3 BIOMARCADORES EM CÂNCER ORAL	36
<b>3. OBJETIVOS</b>	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	40
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	40
4.2 CASUÍSTICA	40
4.3 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO	40
4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS	41
4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	41
4.6 TISSUE MICROARRAY (TMA)	43
4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA	44
4.7.1 Imunohistoquímica p63 (Clone VS38c) e p40 - ΔNp63 (Clone BC28)	44
4.7.2 Análise de expressão protéica	45
4.7.3 Validação TMA	46
4.8 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN-SITU</i> UTILIZANDO SONDAS DE RNA	47
4.8.1 Análise da expressão de p63 mRNA	48
4.9 PROGNÓSTICO	49
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
<b>5. RESULTADOS</b>	52
5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	52

5.2 EXPRESSÃO DE p63.....	61
5.3 EXPRESSÃO DE p40.....	67
5.4 EXPRESSÃO DE p63 mRNA .....	73
5.5 EXPRESSÃO DE p63, p40 e p63 mRNA .....	79
5.6 <b>ANÁLISES DE SOBREVIVÊNCIA</b> .....	81
5.6.1 Sobrevida global.....	81
5.6.3 Sobrevida livre de doença.....	86
6. <b>DISCUSSÃO</b> .....	90
7. <b>CONCLUSÃO</b> .....	99
8. <b>REFERÊNCIAS</b> .....	100
9. <b>APÊNDICES</b> .....	108



## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um grave problema de saúde global. De acordo com dados do GLOBOCAN, publicados pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), foram diagnosticados aproximadamente 14,1 milhões de casos da doença e cerca de 8,2 milhões de mortes em todo o mundo no ano de 2012. (FERLAY et al., 2015)

Mundialmente o câncer bucal representa 2% de todos os casos de câncer, com quase 50% de taxa de mortalidade. O carcinoma epidermóide constitui mais de 90% de todos os casos de câncer existentes na região da cabeça e pescoço, incluindo a cavidade oral e a orofaringe. (FERLAY et al., 2015)

O prognóstico de indivíduos acometidos com carcinoma epidermóide oral (CEO) depende principalmente do estadio no momento do diagnóstico e da localização tumoral. No entanto, como a maioria dos casos é diagnosticada tardiamente e apresentam doença avançada, seu prognóstico é muitas vezes desfavorável e a taxa de mortalidade é elevada. (OKADA et al., 2003)

Avanços nas técnicas de biologia molecular têm permitido ampliar o conhecimento sobre os eventos envolvidos na carcinogênese. Neste sentido, é primordial a caracterização de alterações moleculares que possam prever o comportamento clínico tumoral e que sejam capazes de atuar complementando os parâmetros clínicos e histológicos já utilizados, com o intuito de identificar grupos de pacientes de alto risco, que podem evoluir com curso clínico mais agressivo. (SCHLIEPHAKE, 2003)

Uma das principais alterações encontradas em câncer de cabeça e pescoço, utilizando análises comparativas de hibridação genômica, é a amplificação do locus genômico na região cromossômica 3q27-qter, onde o gene P63 está localizado. Este foi o evento mais frequente identificado nesses tipos de câncer, com uma frequência do ganho cromossômico variando de 77% a 83%, sugerindo que esta área pode possuir um importante gene envolvido na iniciação ou na progressão da doença. (SPEICHER et al., 1995)

Assim, a caracterização de CEO por meio de marcadores específicos, como p63, visa elucidar as variações individuais de curso clínico e contribuir com informações mais precisas de prognóstico, podendo ainda, revelar prováveis alvos terapêuticos. (SCHLIEPHAKE, 2003)

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

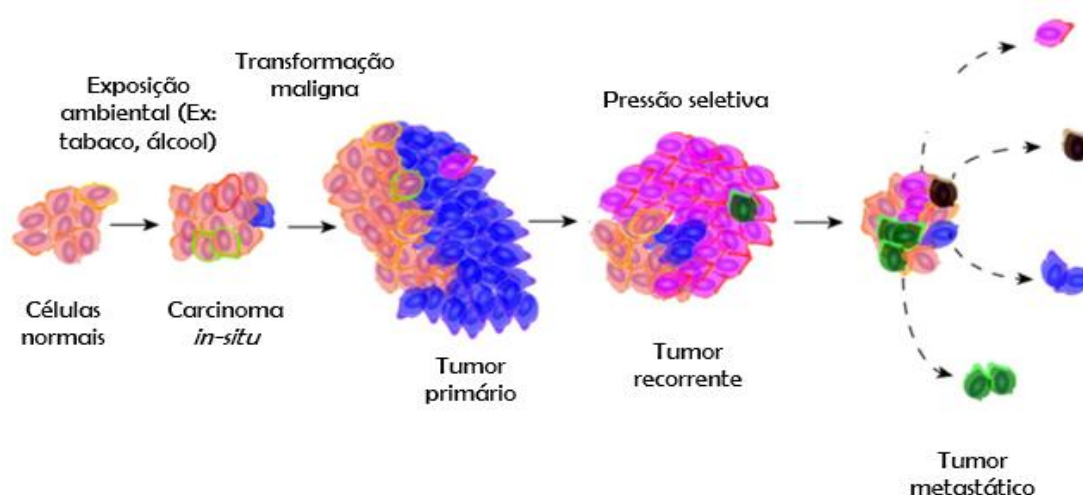
A transformação de uma célula normal em uma célula tumoral é um processo multifatorial complexo e dinâmico que compreende o acúmulo de diversas alterações genéticas e epigenéticas.

As modificações genéticas podem apresentar-se na forma de mutações em determinados genes, como genes supressores tumorais e oncogenes, envolvendo ganho ou perda de material cromossômico ou ainda perda de heterozigosidade, levando à falhas no processo de reparo do DNA (SINHA et al., 2015).

Múltiplos elementos essenciais são requeridos para a tumorigênese, como potencial replicativo ilimitado, autonomia, capacidade de evadir ao sistema imune e vias de apoptose, insensibilidade aos sinais anti-crescimento, estímulo à angiogênese, invasão e metástase (HANAHA; WEINBERG, 2000).

A carcinogênese oral inicia-se com a transformação de um número limitado de queratinócitos normais. Estas transformações alteram mecanismos de reparo do DNA, estimulando a progressão do ciclo celular, interferindo na apoptose e diferenciação celular, resultando em queratinócitos alterados capazes de transmitir essas alterações aos seus clones. Subsequentemente, os genes sofrem pressões seletivas do microambiente oral que acabam por permitir perpetuar as células transformadas com melhores vantagens adaptativas, sobrevivência e proliferação do que as células vizinhas normais, conforme esquematizado na figura 1 (FELLER et al., 2013).

O carcinoma epidermóide constitui cerca de noventa por cento de todas as neoplasias malignas da cavidade bucal e é comumente localizado na língua e assoalho bucal. O câncer oral é uma doença cuja incidência aumenta com a idade, principalmente acima dos 40 anos, no qual o consumo de álcool e tabaco são considerados fatores de risco principais e encontram-se presentes em cerca de 90% dos casos (RIVERA; VENEGAS, 2014).



**Figura 1** - Seleção de subpopulações de células tumorais durante a progressão tumoral, recorrência e metástase. Os clones mais sensíveis, com alterações genéticas ou epigenéticas (azul) desfavoráveis de serão eliminados enquanto os clones resistentes (rosa) adquirem vantagens de sobrevivência. Laranja: células normais; Esboço colorido: lesões pré-malignas; Azul, rosa, verde escuro e marrons: diferentes clones malignos. Fonte: Modificado de RAPISUWON; VIETSCH; WELLSTEIN, 2016.

Em 1986, o IARC estabeleceu o tabaco como carcinógeno e considerou o risco de desenvolver câncer oral para os fumantes cerca de três vezes maior do que para os não fumantes. O cigarro reduz a imunidade da mucosa oral e possui diversos elementos pré-carcinogênicos como as nitrosaminas, benzopirenos e aminas aromáticas, capazes de sofrerem alterações por enzimas oxidativas e ligarem-se covalentemente ao DNA, além de produzirem uma série de radicais livres extremamente reativos, favorecendo mutações (RIVERA, 2015; WHO, 1986).

De modo similar, a exposição ao álcool participa da carcinogênese sistemicamente e localmente. Em resposta ao consumo de álcool, o estresse oxidativo é induzido, gatilhos de ativação de espécies reativas de oxigênio sinalizam cascatas e alteram os microambientes tumorais que são responsáveis pela manutenção do potencial indiferenciado, proliferação e sobrevivência de células-tronco tumorais, o que está relacionado com agressividade, recorrência e resistência terapêutica (XU; LUO, 2017).

Além disso, o etanol aumenta a permeabilidade da mucosa oral, dissolvendo os componentes lipídicos epiteliais, podendo gerar atrofia, interferência na síntese de DNA e reparo. O etanol também está relacionado à diminuição do fluxo salivar e à

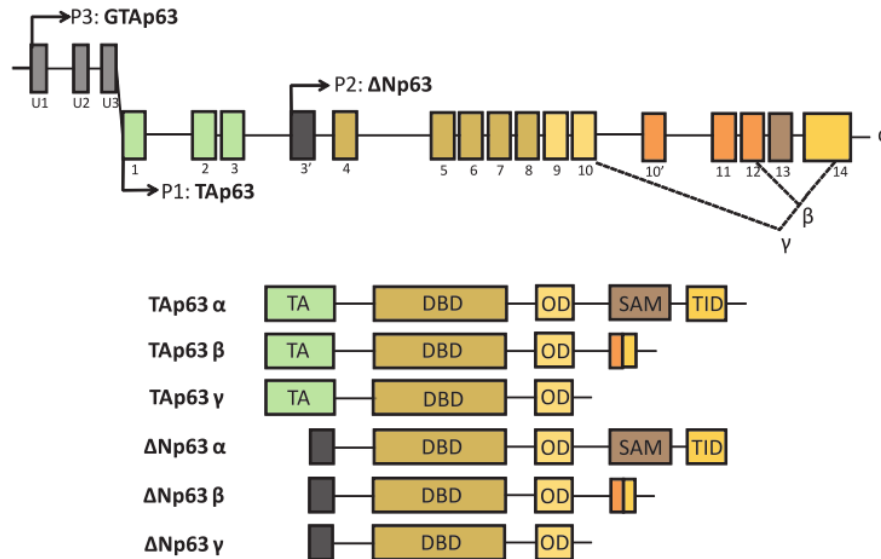
redução da eficiência hepática em processar componentes carcinogênicos. Ademais, exposição crônica ao álcool pode levar à deficiências na imunidade inata, elevando os níveis de falha imune e defeitos no material genético, contribuindo assim para a carcinogênese de diferentes tumores, incluindo o CEO (RIVERA, 2015).

## 2.2 TP63

P63 e P53 assim como P73 pertencem a mesma família evolutivamente conservada em animais. Eles derivam de um gene ancestral, que em determinado momento evolutivo divergiu da sequência original. Análises filogenéticas revelam que o membro fundador da família foi P63, seguido de P73 e, finalmente, P53. Os 3 genes compartilham uma organização muito semelhante de éxons e íntrons, no entanto, P63 e P73 estão mais intimamente relacionados entre si do que com P53. Ao contrário de P53, tanto P63 como P73 sofrem *splicing* alternativo e P63 ainda possui três promotores internos (FERRAIUOLO et al., 2016; WEBER et al., 2002).

A elevada homologia de sequência nos domínios de ligação do DNA (DBDs) entre os membros da família, presente em mais de 70%, não é observada nos domínios adjacentes e regiões C-terminais, que divergem bastante entre si. Tal homologia esclarece a atuação de P73 e P63 na regulação de muitos genes alvo conhecidos por serem regulados por P53, como por exemplo NOXA, P21, MDM2, PUMA e BAX, embora o conjunto completo de genes alvo regulados sob condições fisiológicas e patológicas ainda não esteja bem elucidado (COSTANZO et al., 2014; YOH; PRYWES, 2015).

O gene humano TP63, também denominado P63, está localizado no cromossomo 3q27-29 e consiste em 14 éxons, totalizando mais de 250Kb, incluído em uma região que é frequentemente amplificada na displasia epitelial e em CEO (GONFLONI; CAPUTO; IANNIZZOTTO, 2015; SINHA et al., 2015).



**Figura 2** - Esquema estrutural de P63. Três promotores (P1, P2, P3) codificam as isoformas TAp63, ΔNp63 e GTAp63. As isoformas TAp63 possuem um domínio de transativação (TA) codificado pelo éxon 1-2-3. Enquanto nas isoformas ΔNp63 o domínio de transativação é inexistente. TAp63 e ΔNp63 compartilham um domínio de ligação ao DNA (DBD) e um domínio de oligomerização (OD). Somente TAp63α e ΔNp63α possuem um domínio alfa esterilizado (SAM) e um domínio de inibição de transativação (TID) na região C-terminal. Fonte: GONFLONI; CAPUTO; IANNIZZOTTO, 2015.

P63 codifica um grupo de pelo menos 6 proteínas distintas (TAp63α, TAp63β, TAp63γ, ΔNp63α, ΔNp63β e ΔNp63γ) que advém de um único gene através de dois promotores diferentes e por meio de *splicing* alternativo dos transcritos primários de RNA (GONFLONI; CAPUTO; IANNIZZOTTO, 2015).

O gene P63 contém dois promotores principais, um localizado no *upstream* do éxon 1 (Promotor 1/P1), o outro no íntron 3 (Promotor 2/P2). O primeiro origina as chamadas isoformas "transativadoras" (TAp63). O segundo promotor gera as isoformas "truncadas" (ΔNp63, também denominado p40), no qual o domínio de transativação (TA) é ausente. Evidências recentes indicam a existência de um terceiro promotor, derivado da fusão de exons "extras" (U1-U2-U3) com o éxon 2. Este promotor gera as chamadas isoformas "pq" (pq) de "GTA" p63 (células germinativas codificadas transativando p63) (Figura 2) (BEYER et al., 2011) .

Todas as proteínas traduzidas de P63 possuem um domínio central. P63 α, β, γ são geradas por meio de *splicing* alternativo da região 3' do RNA, produzindo proteínas com comprimentos C-terminais diferentes. Duas variantes com diferentes terminações-N existem, uma denominada de forma TA, que contém um domínio de transativação terminal com 22% de homologia ao domínio de transativação de p53,

enquanto a outra forma denominada  $\Delta N$  não possui esse domínio N-terminal (NYLANDER et al., 2002) .

A principal função de P63 é manter o potencial proliferativo das células progenitoras epidérmicas, além de participar do controle da expressão de genes específicos envolvidos na homeostase, integridade do tecido epitelial e sobrevivência celular, bem como migração e transição epitélio-mesênquima. Camundongos P63 *knockout* nascem apresentando membros defeituosos ou falta de estratificação epitelial, resultando em morte do animal logo após o nascimento em decorrência de desidratação. Esses animais também não possuem cabelo ou dentes e apresentam defeitos no desenvolvimento das glândulas mamárias. Adicionalmente, a deficiência de p63 pode induzir senescência celular tanto *in vitro* quanto *in vivo*, através da regulação p19<sup>Arf</sup>/ p53 e vias p16<sup>Ink4a</sup>/Rb. TAp63 previne o envelhecimento precoce dos tecidos e mantém os precursores dérmicos e epidérmicos, enquanto  $\Delta Np63$  é necessário para a diferenciação inicial dos progenitores em queratinócitos (COSTANZO et al., 2014; GUO; MILLS, 2007; MELINO et al., 2015. NYLANDER; COATES; HALL, 2000).

A p63 foi encontrada em uma série de tecidos murinos e humanos, predominantemente localizada em camadas de células em proliferação. TP63 é pouco mutado e apresenta baixos níveis de deleção em humanos. Quando ocorrem, as mutações se dão principalmente nos éxons 13 e 14, gerando diversos tipos de displasias ectodérmicas. Pesquisas em vários tipos de tumores revelaram mutações pontuais no domínio de ligação ao DNA em apenas 3 tumores, todos de origem epidérmica. Em contrapartida, em determinados cânceres humanos, como nos carcinomas epidermóides, especialmente os pouco diferenciados,  $\Delta Np63$  é abundante devido à amplificação genômica (COSTANZO et al., 2014; WEBER et al., 2002).

Estudos de alterações genéticas em  $\Delta Np63$  demonstraram que a frequência do ganho cromossômico é elevada. Por outro lado, a deficiência de p63 mostrou não predispor, mas sim proteger contra o desenvolvimento tumoral, visto que a perda de p63 ativa

vias de senescência celular (GUO; MILLS, 2007; NYLANDER; COATES; HALL, 2000; SPEICHER et al., 1995; YAMAGUCHI et al., 2000).

A expressão de p63 tem um papel importante no desenvolvimento de epitélios normais e possui uma distribuição tecido-específica: no epitélio estratificado escamoso, as isoformas TA são mais expressas nas camadas superficiais, enquanto  $\Delta N$  (principalmente  $\Delta Np63\alpha$ ) são específicas para células basais, onde atuam na proliferação celular. Em glândulas, como glândulas mamárias ou próstata, p63 é expressa apenas em células da camada basal (MELINO et al., 2015).

Ambos, TAp63 e  $\Delta Np63$  são responsáveis pela regulação de miRNAs, uma classe de pequenos RNA não codificantes. Os miRNAs desempenham um papel na repressão protéica pós-transcricional. Alguns miRNAs podem controlar a expressão de p63 e o próprio p63 promove a transcrição de diversos miRNAs. Em CEO,  $\Delta Np63$  promove expressão de miR-630 ao mesmo tempo que reprime miR-181a, miR-519a e miR-374a. Esses miRNAs podem controlar a expressão de  $\Delta Np63$ , devido a certa complementaridade entre a sua sequência e a região 3'UTR de  $\Delta Np63$ . P63 regula outros miRNAs como os membros da família miR-200, que controlam a transição epitélio-mesenquimal (TEM), mecanismo típico para promover invasão e metástase (MELINO, 2011).

Apesar de ainda ser uma questão que gera debate, tem sido mostrado que TAp63 é a primeira isoforma expressa durante o desenvolvimento epidérmico, e é necessária para a estratificação epitelial, enquanto inibe a diferenciação terminal. Após o início da estratificação, as isoformas  $\Delta Np63$  induzem a expressão de genes necessários para os estágios posteriores da morfogênese epidérmica, mas para prosseguir a diferenciação  $\Delta Np63$  precisa ser subsequentemente eliminada. A depleção de  $\Delta Np63$  ocorre principalmente através da degradação proteassomal, que por sua vez é controlada por várias proteínas, algumas das quais são alvos transcricionais do próprio  $\Delta Np63$  (COSTANZO et al., 2014).

Nos queratinócitos proliferantes das camadas basais,  $\Delta Np63$  controla a expressão das queratinas K5 e K14 da camada basal, além das moléculas necessárias para a



formação da barreira epidérmica, como Alox12. Em resposta aos estímulos de diferenciação,  $\Delta Np63$  ativa os genes necessários para finalização do ciclo celular (IKKa e IRF6) e reorganiza a transcrição de moléculas de adesão para permitir que os queratinócitos deixem a camada basal e estratifiquem. Assim, as diferenças de combinação das isoformas expressas e a atividade de transcrição de p63 podem influenciar no conjunto de genes transcritos em um determinado momento e em uma determinada célula (COSTANZO et al., 2014).

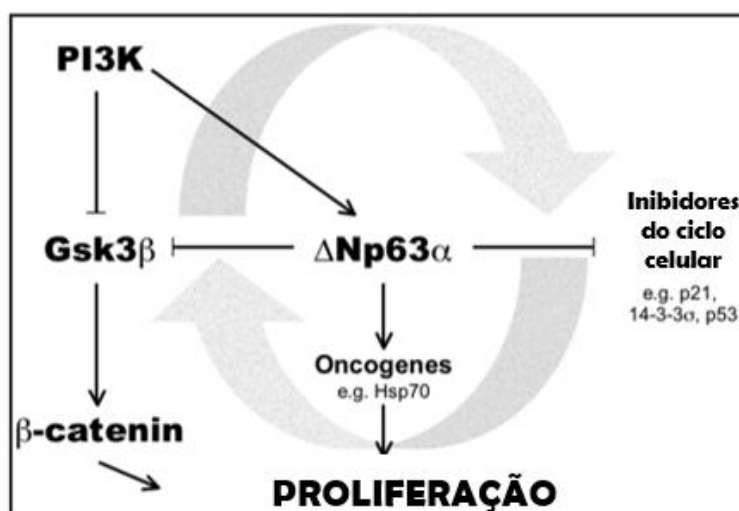
P40, também denominado p51 ou  $\Delta Np63$ , é o transcrito mais curto entre as inúmeras diferentes variantes. As isoformas  $\Delta Np63$  ( $\Delta Np63\alpha$ ,  $\Delta Np63\beta$ ,  $\Delta Np63\gamma$ ) são consideradas também fatores de transcrição, induzindo diferentes genes alvo fundamentais para a manutenção de células-tronco e células progenitoras em epitélios estratificados e tecidos glandulares. Apesar de não possuírem um domínio de transativação, as isoformas  $\Delta Np63$  apresentam um domínio de ligação que tem a capacidade de se unir a p53, podendo atuar como dominantes negativas da transativação de P53 e TAp63 por meio da competição pelo sítio de ligação do DNA, podendo, assim, inibir suas funções (NYLANDER et al., 2002; YAMAGUCHI et al., 2000).

$\Delta Np63$  é indispensável para manter a capacidade de auto-renovação de células-tronco em diversas estruturas epiteliais. Os tecidos epiteliais são mantidos por células-tronco de ciclagem lenta, auto-renováveis, que usam divisão assimétrica para manter uma população de progenitores, que sofrem um número limitado de divisões celulares e eventualmente diferenciam-se. A perda específica de  $\Delta Np63$  em camundongos provoca a formação de uma estrutura epidérmica aberrante, composta por aglomerados isolados de células epiteliais desorganizadas, ocasionando diferenciação prejudicada de células epiteliais estratificadas (MELINO et al., 2015).

Assim como a indução da senescência é mediada por deficiência de p63, numerosas evidências apontam função pró-proliferativa ou pró-sobrevivência em abundância de p63. Foi demonstrado através de *microarrays* que  $\Delta Np63$ , mas não TAp63, regula Hsp70, um gene que está ativamente envolvido na inibição da apoptose e aumento da sobrevivência.  $\Delta Np63\alpha$  transativa a expressão de Hsp70 por interação direta com

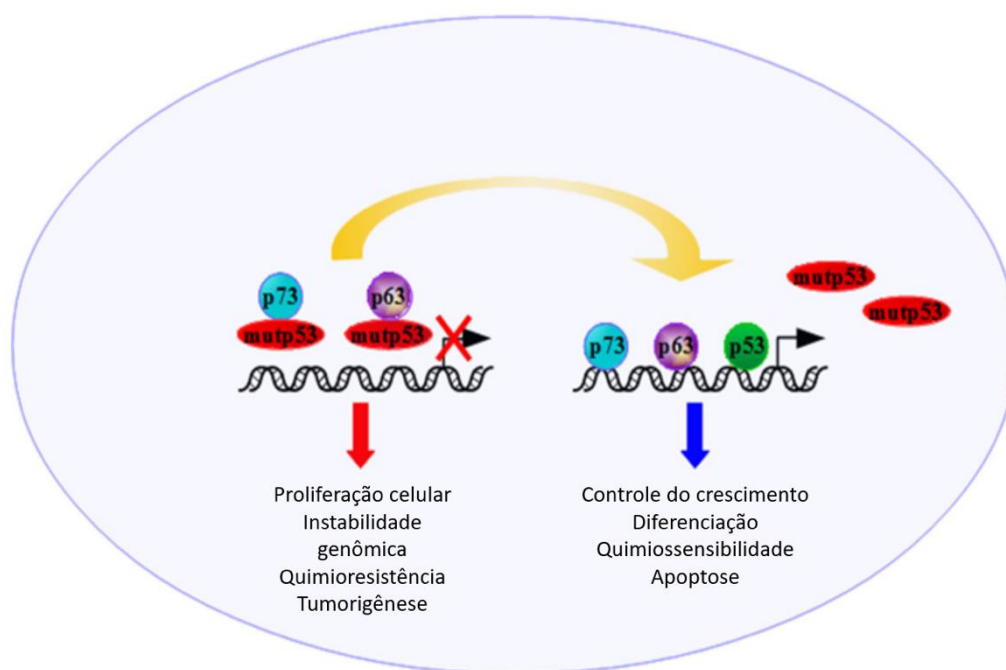
o fator de ligação CCAAT. Por outro lado,  $\Delta\text{Np63}\alpha$  também pode ligar-se às regiões reguladoras de genes que inibem o ciclo celular, como P21, P53 e 14-3-3 $\sigma$ , reprimindo sua transcrição. A expressão de  $\Delta\text{Np63}\alpha$  é induzida pela ativação do fator de crescimento epidérmico através da via da fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K), que é um potente fator pró-sobrevivência e pró-proliferação celular (Figura 3). Sendo  $\Delta\text{Np63}\alpha$  um alvo de PI3K,  $\Delta\text{Np63}\alpha$  é fundamental para proliferação e sobrevivência celular (GUO; MILLS, 2007).

Tap63 previne o envelhecimento precoce dos tecidos, proporciona preservação das células germinativas e estabilidade genômica em células-tronco adultas, além demonstrar *in vitro* papel na proteção contra metástases. Inativação e/ou perda de Tap63 podem promover um fenótipo metastático e invasivo. Estudos revelam que Tap63 $\beta$  e Tap63 $\gamma$  podem transativar genes alvos de P53 em níveis comparados à própria P53, enquanto não foi demonstrado que Tap63 $\alpha$  possua esta capacidade, mesmo que apresente a mesma sequência (COSTANZO et al., 2014; GONFLONI; CAPUTO; IANNIZZOTTO, 2015).



**Figura 3** -  $\Delta\text{Np63}\alpha$  promove a proliferação celular através da inibição da atividade de GSK3 $\beta$  que ocorre por meio da inibição da proteína fosfatase PP2A. A diminuição da atividade de GSK3 $\beta$  leva à acúmulo nuclear de  $\beta$ -catenina, que tem função pró-proliferativa.  $\Delta\text{Np63}\alpha$  é induzida por EGF através da via PI3K.  $\Delta\text{Np63}\alpha$  pode promover a proliferação celular induzindo proteínas oncogênicas, como Hsp70. Por outro lado,  $\Delta\text{Np63}\alpha$  pode inibir a atividade genes inibidores do ciclo celular como p53, p21 e 14-3-3 $\sigma$ , aumentando assim a proliferação celular. Fonte: Modificado de GUO; MILLS, 2007.

Mais recentemente tem sido relatada interação *in vitro* de formas mutantes de p53 com p63 e p73 (Figura 4). As formas mutantes de p53 (mutp53) interagem com p63 através de seus domínios de ligação (DBD). Apesar das mudanças conformacionais presentes em mutp53, estas ainda são capazes de ligarem-se à p63. A interação entre mutp53 e TAp63 resulta em comprometimento da ativação transcricional de seus genes alvo (Bax, p21waf1, Cyclin G, 14-3-3 $\sigma$  e p53AIP1). A formação de um complexo mutp53-p63 está diretamente relacionado à promoção da invasão celular e metástase em várias linhagens celulares tumorais através da inativação das funções de supressão tumoral de TAp63, enquanto, por outro lado, mutp53 tem interações de baixa afinidade com  $\Delta$ Np63 $\alpha$  ou  $\Delta$ Np63 $\gamma$  (FERRAIUOLO et al., 2016).



**Figura 4** - P53 mutante e seus efeitos em p63. Mutp53 se liga à TAp63 através dos domínios de ligação. A presença de p53 mutante prejudica as funções de supressão tumoral de TAp73 e TAp63. Fonte: Modificado de FERRAIUOLO et al., 2016.

Devido ao gene P63 apresentar um papel específico na manutenção de populações de células-tronco de queratinócitos, tem sido sugerido que a expressão de p63 possa ser utilizada como marcador de células-tronco em uma variedade de tipos de células epiteliais, incluindo o endométrio, colo do útero, mama e próstata, bem como no

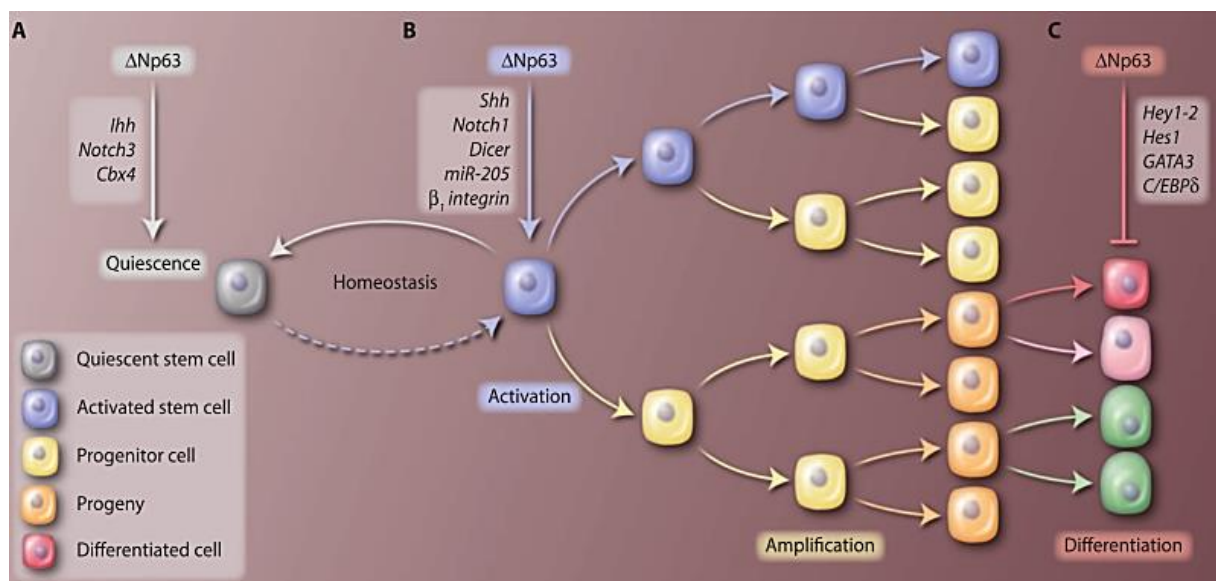
epitélio escamoso estratificado da cavidade bucal. Estudos em tumores humanos primários e linhagens celulares têm mostrado a participação de p63 no crescimento e desenvolvimento de tumores epiteliais (NYLANDER et al., 2002; STACY et al., 2017).

Diferentes concentrações de p63 podem influenciar nas propriedades das células-tronco. As células-tronco utilizam divisões celulares assimétricas e simétricas para gerar suas células progenitoras. A divisão celular assimétrica gera simultaneamente uma outra célula-tronco e uma célula progenitora, enquanto a divisão simétrica produz duas células-tronco ou progenitoras idênticas. Na ausência de p63 ou em condições no qual p63 é inativada, as células-tronco possuem potencial de auto-replicação diminuído e podem alternar para um modo de divisão celular simétrica para produzir dois progenitores idênticos, perdendo progressivamente a capacidade de expansão. Quantidades fisiológicas de p63 podem regular a capacidade de auto-renovação das células-tronco normais, enquanto quantidades suprafisiológicas de p63 poderiam desregular o equilíbrio entre divisões de células-tronco simétricas e assimétricas, aumentando assim o potencial replicativo celular levando à tumorigênese (MELINO et al., 2015).

$\Delta$ Np63 é responsável por preservar a capacidade de auto-renovação das células tronco epiteliais através de vários mecanismos, controlando a expressão de grupos distintos de genes. Um dos mecanismos de ação é por meio da promoção de quiescência celular, preservando a capacidade auto-renovativa (Figura 5A). Alternativamente,  $\Delta$ Np63 pode manter esta capacidade por impor um modo de divisão assimétrico, no qual, a cada mitose, é produzida uma célula-tronco e também uma célula progenitora (Figura 5B).  $\Delta$ Np63 pode ainda reprimir a habilidade de células progenitoras diferenciarem-se, imprimindo permanência de fenótipos indiferenciados (Figura 5C) (MELINO et al., 2015).

Em células tronco tumorais  $\Delta$ Np63 pode induzir divisões celulares simétricas, o que geraria duas células-tronco tumorais auto-renováveis. Ao expandir o grupo de células progenitoras tumorais dessa maneira,  $\Delta$ Np63 contribuiria para o crescimento e progressão do tumor.  $\Delta$ Np63 pode ainda aumentar o potencial de auto-renovação das células-tronco tumorais, contrariando a função de supressão tumoral de p53. Para controlar a homeostase dos tecidos, de fato, p53 impõe um curso proliferativo

assimétrico nas células filhas. Por outro lado, perda da atividade de p53 aumenta a auto-renovação das células-tronco deslocando a divisão celular de uma modalidade assimétrica para uma modalidade simétrica. Uma taxa aumentada de divisões simétricas durante a carcinogênese da mama foi atribuída à atenuação da sinalização de p53, apesar de estudos mostrarem manutenção do potencial replicativo fornecido por p63 através de mecanismos independentes de p63 (MELINO et al., 2015; MEMMI et al., 2015).



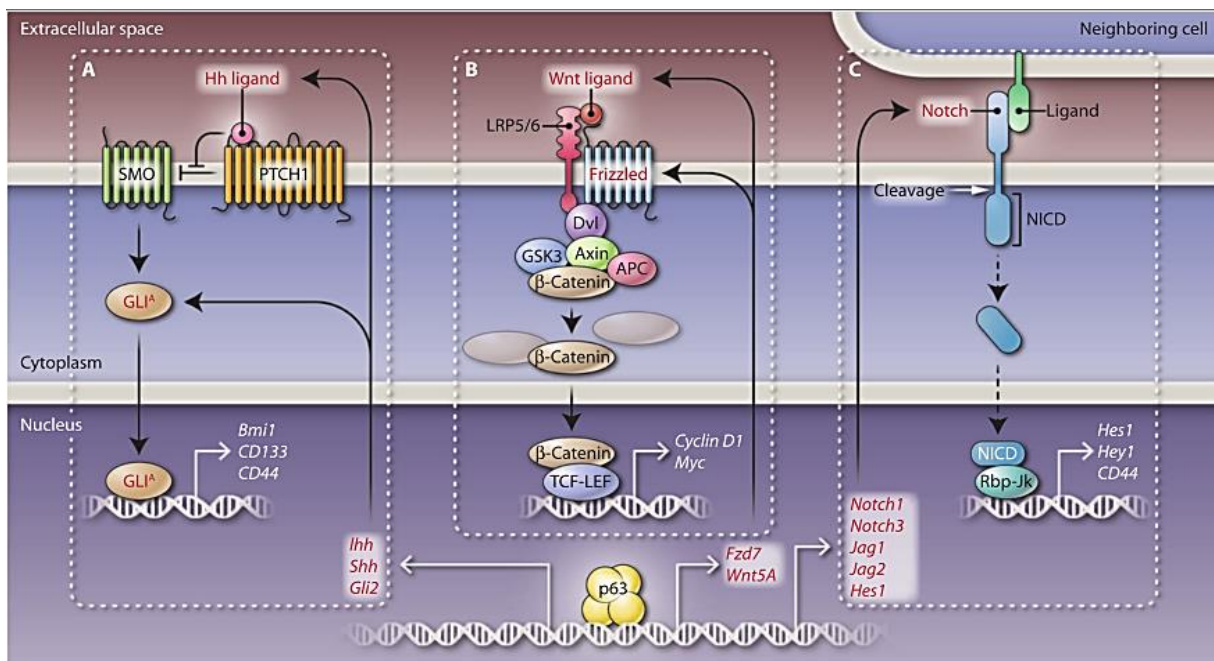
**Figura 5** - Modelo de participação de  $\Delta Np63$  na auto-renovação das células-tronco epiteliais. (A e B)  $\Delta Np63$  pode manter o estado quiescente das células-tronco, preservando assim a capacidade de auto-renovação (A), ou promover a divisão assimétrica de células-tronco após a ativação, produzindo células com destinos distintos (B). (C)  $\Delta Np63$  pode ainda suprimir vias de diferenciação do grupo progenitor. Fonte: Modificado de MELINO et al, 2015.

A desregulação de genes envolvidos com o potencial auto-regenerativo é um evento comum na tumorigênese. Compreender como p63 participa dessas vias é crucial para conhecer a participação dessa proteína nos processos de iniciação e progressão tumoral.

Uma via de sinalização relevante na regulação das células estaminais é a via Hedgehog (Hh), no qual um dos ligantes secretados: Sonic, Desert, ou Indian se liga aos receptores Patched (PTCH). Na ausência dos ligantes Hh, o receptor PTCH1 inibe a proteína trans-membrana Smoothened (SMO). A conexão do ligante Hh ao

PTCH1 inibe a atividade inibitória do receptor e leva à ativação do SMO, que então transduz o sinal Hh para o citoplasma. Como resultado, as proteínas GLI tornam-se ativadores transcripcionais (GLI<sup>A</sup>) e induzem a expressão dos genes alvo Hh, que regulam a expressão de genes que codificam marcadores de células-tronco, como BMI1, LGR5, CD44 e CD133, incluindo os envolvidos na regulação das células estaminais.

P63 contribui para o fenótipo estaminal através da sua capacidade de ligar-se aos promotores de vários componentes da via de sinalização Hh, como o próprio ligante Hh, e GLI (Figura 6). Ihh, é um alvo transcricional de regulação positiva por ativação de TAp63 e negativa por inibição de  $\Delta$ Np63. A distribuição seletiva de TAp63 ativa a expressão de Ihh, promovendo assim expansão desse compartimento. Em contraste,  $\Delta$ Np63 reprime Ihh em células quiescentes, preservando seu estado adormecido e sua capacidade de auto-renovação. Sendo assim, uma vez que a indução Gli3 por Ihh aumenta a expressão de TAp63, o uso do promotor  $\Delta$ Np63 é reduzido. Assim, uma a expressão TAp63 pode aumentar a expressão de Ihh (MELINO et al., 2015; YOH; PRYWES, 2015).



**Figura 6** - p63 controla as vias de sinalização Hh, WNT e Notch que participam do desenvolvimento e manutenção de células-tronco. (A) A ligação de Hh leva à ativação do SMO que ativa GLI e induzindo a expressão dos genes alvo Hh. Os componentes Hh que estão sob o controle de transcrição de p63 estão marcados em vermelho. (B) A ligação de WNT inibe a destruição de  $\beta$ -catenina que se acumulada é translocada para o núcleo e associa-se com TCF/LEF para regular a expressão de genes alvo que conferem um fenótipo progenitor. Ao induzir a transcrição do receptor Frizzled FZD7, p63 potencializa a ativação da via WNT. (C) A via de sinalização Notch é iniciada através da interação dos receptores Notch com ligantes Jagged e Delta em células adjacentes. NICD é clivada, entra no núcleo ativa a transcrição de genes alvo. P63 regula a expressão dos genes que codificam os receptores Notch os quais influenciam as propriedades das células-tronco. Fonte: Modificado de MELINO et al., 2015.

A via WNT também é uma reguladora importante da manutenção de células-tronco epiteliais. Na ausência de um ligante,  $\beta$ -catenina é constitutivamente fosforilada, e como resultado, é levada à degradação proteossomal. Na presença do ligante, um receptor da família Frizzled (FZD) e co-receptores LRP são acionados, levando à inibição da fosforilação da  $\beta$ -catenina, que conseqüentemente acumula-se no citoplasma e é transferida ao núcleo, onde interage com proteínas de ligação (LEF/TCF), para conectar-se a promotores alvos específicos. O papel de p63 no potencial indiferenciado ocorre através do controle transcricional direto do receptor FZD7 e em algumas situações do ligante WNT5B, o que tem sido mostrado em alguns estudos, como o de Chakrabarti et al, 2014. Superexpressão de FZD7 também resulta no aumento de atividade de células tronco com potencial clonogênico. P63 também foi encontrado para regular a expressão de Myc e  $\beta$ -catenina em carcinomas de células escamosas esofágicas, sugerindo o funcionamento geral de uma via p63/ $\beta$ -catenina/Myc na tumorigênese (CHAKRABARTI et al., 2014; YOH; PRYWES, 2015).

$\Delta$ Np63 $\alpha$  foi associada à glicogênio sintase quinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) e à via  $\beta$ -catenina.  $\Delta$ Np63 liga-se à GSK3 $\beta$  e à subunidade reguladora da proteína fosfatase PP2A, levando à inibição da reativação do GSK3 $\beta$  e subseqüentemente diminuindo a fosforilação e acúmulo nuclear de  $\beta$ -catenina. Aumento da  $\beta$ -catenina nuclear tem sido fortemente relatada em cânceres humanos. A capacidade de p63 mediar a sinalização de  $\beta$ -catenina fornece uma molécula base para a função oncogênica de p63. Regulação por p63 da atividade de GSK3 $\beta$  pode fornecer um conceito importante quanto a um mecanismo pelo qual a deficiência de p63 provoca senescência celular (GUO; MILLS, 2007).

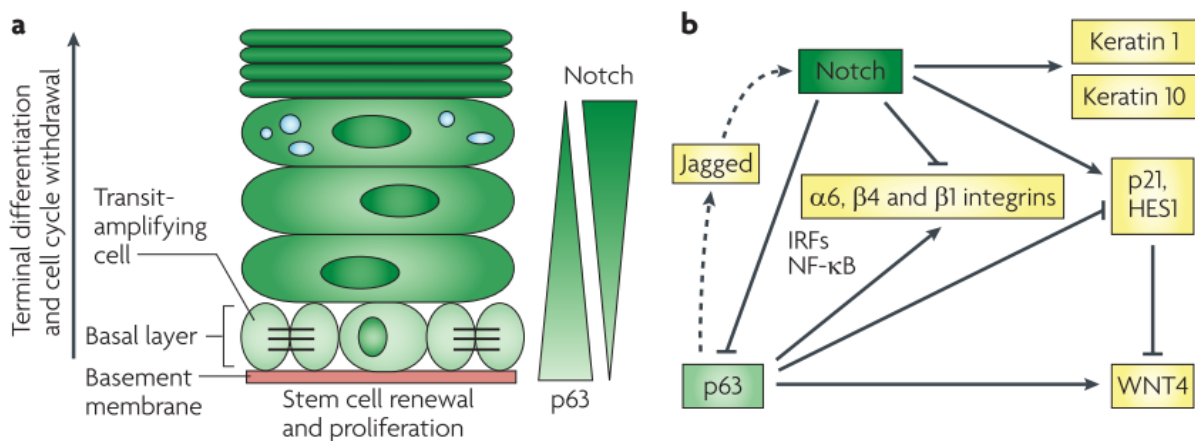
A via Notch desempenha papel fundamental na homeostase e morfogênese de diversos órgãos e principalmente na diferenciação dos queratinócitos. A via Notch é induzida em resposta à ligação dos receptores Notch (Noth 1-4) aos ligantes transmembrana Delta ou Jag. Essa ligação leva à ruptura de Noth e liberação do domínio intracelular (NICD) no citoplasma. NICD é translocado para o núcleo onde ativa RPB-Jk, uma proteína de ligação de DNA (figura 6) (CANDI et al., 2007).

$\Delta$ Np63 afeta a sinalização de Notch pela regulação da expressão de diversos componentes da via, como Notch 1, Notch 3, Jag 1, Jag 2 e genes Hes1. Na camada basal do epitélio, gradientes opostos de p63 e Notch governam o balanço entre auto-renovação e diferenciação celular. Estudos têm mostrado que a ativação de Noth suprime a expressão de p63 em queratinócitos, células progenitoras ectodérmicas e células epiteliais mamárias. Por outro lado, atividades estimulantes exercidas por p63 na via Notch promoveriam a quiescência de células tronco e ações repressivas promoveriam ativação e diferenciação celular (Figura 7) (NGUYEN et al., 2006; YOH; PRYWES, 2015).

O balanço entre Notch e p63 participa do equilíbrio entre populações de queratinócitos que são auto-renováveis e células que estão em diversos estágios de diferenciação. Na epiderme os queratinócitos passam por um processo vertical de diferenciação, indo do compartimento basal de proliferação até as camadas mais superiores, onde ocorre a diferenciação terminal. No compartimento proliferativo, existe um equilíbrio entre células de ciclagem lenta, que possuem potencial aumentado de auto-renovação mas estão em menor número com populações já comprometidas que estão dividindo-se ativamente, mas apenas por um número limitado de vezes. A oposição entre as expressões de p63 e a atividade Notch existem nas camadas basais, mas não nas camadas superiores da epiderme. Isso pode resultar, em parte, de sua regulação negativa recíproca. A atividade elevada de Notch suprime a expressão de p63 através da modulação de fatores responsivos à interferon (IRFs) e do fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Por sua vez, p63 liga-se à HES1, CDKN1A (que codifica p21) e WNT4, contrariando os efeitos de Notch na sua expressão. Em paralelo com esses efeitos antagônicos, p63 também pode ter ação sinérgica com a sinalização de Notch nos primeiros passos da diferenciação (caracterizada pela expressão de queratina 1 e



queratina 10), através de um mecanismo parácrino envolvendo a indução de expressão de ligantes Jagged e ativação de Noth em células vizinhas. A modulação descendente de p63 por aumento da sinalização de Notch poderia então ser um sinal para que os estágios de diferenciação posteriores ocorram (figura 7) (DOTTO, 2009).



**Figura 7** - Relação entre p63 e Notch. A) No compartimento proliferativo, um equilíbrio existe entre células de ciclagem lenta com potencial aumentado de auto-renovação e populações já comprometidas que estão dividindo-se ativamente (trânsito de células em ampliação). Nas camadas basais a expressão de p63 e Notch são opostas. B) A atividade elevada de Notch suprime p63 por meio da modulação de IRFs e de NF-κB. P63 liga-se a HES1, p21 e WNT4, contrariando os efeitos de Notch. P63 também pode ter ação sinérgica com a sinalização de Notch nos primeiros passos da diferenciação (queratina 1 e 10), através de um mecanismo parácrino (ilustrado por setas pontilhadas) envolvendo a indução de expressão de ligantes Jagged e ativação de Noth em células vizinhas. Fonte: Modificado de DOTTO, 2009.

A participação de p63 na tumorigênese, dependente ou independente de p53, ainda é controversa. Em diversos tumores, essas proteínas são subexpressas, enquanto que em outros, são sobreexpressas ou apresentam seus genes amplificados. Este contrassenso deve-se principalmente às diferentes isoformas, à localização específica tecidual e, também, propriamente às funções exercidas por essas proteínas. Dessa forma, o efeito é dependente do balanço existente entre TA e ΔN, das interações e da ligação de p63 aos promotores de genes alvos (FERRAIUOLO et al., 2016; MELINO et al., 2015).

Em resumo, p63 regula uma série de vias intracelulares e forma uma rede molecular complexa, na qual o número de isoformas adiciona ainda mais complexidade a este sistema. P63 poderia agir como oncogene durante a tumorigênese, quer facilitando a

expressão de genes pró-proliferativos como o Hsp70 ou pela inibição da expressão de genes reguladores da proliferação tais como p21 e GSK3 $\beta$  quinase (GUO; MILLS, 2007). O papel preciso de cada isoforma de p63 ainda não é bem estabelecido, mas sabe-se que as isoformas que possuem o domínio transativante atuam em genes alvo p53, induzindo vias apoptóticas. Quando este domínio é perdido, a isoforma  $\Delta$ Np63 atua de forma dominante negativa na transativação das proteínas p53 e p63 (GUARDAGNO et al., 2016).

## 2.3 BIOMARCADORES EM CÂNCER ORAL

O termo biomarcador refere-se a um recurso que está associada ao desfecho de uma doença. Um biomarcador de prognóstico informa sobre um possível desfecho, por exemplo: recidiva da doença, progressão da doença ou óbito, independente do tratamento recebido. Por outro lado, um biomarcador de progressão tumoral indica a capacidade tecidual de progressão de um epitélio normal, para um epitélio displásico, carcinoma *in situ* ou câncer propriamente dito. Até o momento, não existem biomarcadores clinicamente disponíveis e específicos para indicar progressão tumoral ou prognóstico em câncer da cavidade bucal. (BALLMAN, 2015; COSTA-PINHEIRO et al., 2015).

Mais de 70% dos casos de câncer bucal são diagnosticados tardiamente, quando a doença encontra-se em estádios avançados (III ou IV), o que, evidentemente, diminui as chances de sobrevivência, apesar das estratégias terapêuticas. A sobrevivência em 5 anos apresenta-se em torno de 50% e a chance de cura em cerca de 30% nesses casos. Os pacientes com doença metastática que não são tratados mostram uma sobrevida de cerca de 4 meses. A terapia empregada para o CEO pode envolver cirurgia e radioquimioterapia, o que comumente leva à redução na qualidade de vida e inúmeras complicações, além de elevado custo. As abordagens típicas para o tratamento utilizadas são recursos terapêuticos demasiadamente dispendiosos e

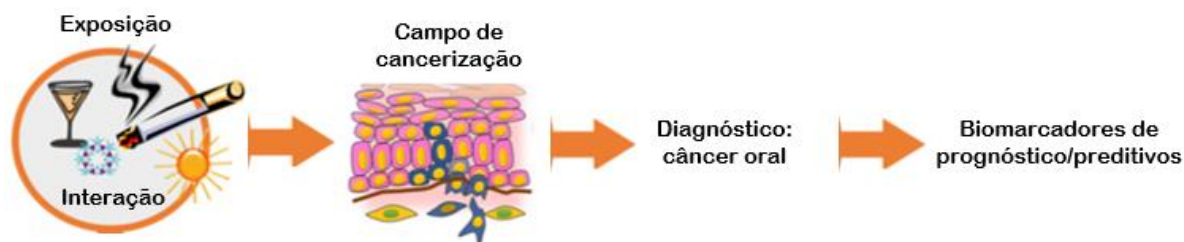
penosos. O diagnóstico precoce e a eficácia do tratamento prosseguem sendo as principais condições para melhorar a sobrevivência de pacientes com estes tumores. (LI et al., 2017; RIVERA; VENEGAS, 2014).

Apesar dos avanços tecnológicos, terapêuticos e farmacológicos atuais, a mortalidade e a morbidade de CEO não reduziram significativamente nas últimas décadas e a taxa de sobrevida relativa em 5 anos permaneceu aproximadamente 52-57, variando entre 80% para tumores diagnosticados em estadio I e 40% para aqueles diagnosticados em estadio IV. Adicionalmente, apesar dos avanços prognósticos de vários tipos de câncer obtidos nas últimas décadas, o prognóstico para pacientes com CEO continua a ser desfavorável, principalmente devido à alta taxa de recidiva local e regional. (NEVILLE; DAY, 2002; RIVERA, 2015).

Rotineiramente os principais critérios para determinar prognóstico e conduta terapêutica em indivíduos com CEO estão baseados no estadiamento clínico (Classificação Tumor Node Metastasis, TNM), sítio anatômico e gradação histológica. Contudo, estes indicadores muitas vezes não são capazes de predizer as elevadas variações na resposta ao tratamento e prognóstico em CEO.

A heterogeneidade tumoral é um grande desafio e a causa fundamental dos piores desfechos, agressividade e principalmente da resistência ao tratamento. Ainda assim, a abordagem diagnóstica padrão baseia-se na análise de uma única amostra de tumor de um único local ou sítio metastático em um único momento determinado (RAPISUWON; VIETSCH; WELLSTEIN, 2016).

Devido à heterogeneidade intratumoral, proveniente da interação de diversos carcinógenos e da seleção de subpopulações celulares em diversas lesões, a abordagem diagnóstica padrão fornecerá apenas uma caracterização limitada da doença. Sendo assim, indivíduos com CEO localizados em mesmo sítio anatômico e com mesmo estadio clínico podem apresentar comportamento tumoral e sobrevida completamente diferentes (Figura 8) (RAPISUWON; VIETSCH; WELLSTEIN, 2016).



**Figura 8** - A interação entre fatores de risco favorece um ambiente de instabilidade genômica. O acúmulo de modificações genéticas progride ao surgimento do câncer. A passagem da cancerização para efetivamente o diagnóstico de câncer oral fornece campo de estudo para biomarcadores de predição e de prognóstico. Fonte: Modificado de RIVERA, 2015.

Considerando estes aspectos, tem sido proposta a utilização de marcadores biológicos capazes de auxiliar na identificação dos processos de progressão tumoral, prognóstico, avaliação da resposta ao tratamento e até mesmo determinar o comportamento biológico tumoral e características relacionadas a agressividade tumoral.

Dessa forma, interesse tem sido mostrado em estudar o potencial oncogênico da proteína p63 na regulação da proliferação e diferenciação celular em diversas neoplasias de origem epitelial, incluindo CEO, devido às alterações de sua expressão nestes tecidos. A aplicabilidade de p63 como potencial biomarcador molecular de prognóstico e progressão tumoral poderá contribuir para o direcionamento do tratamento, buscando ampliar a sobrevida e qualidade de vida dos pacientes acometidos pelo CEO.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de P63 como potencial biomarcador de prognóstico e de progressão tumoral em Carcinoma Epidermóide Oral.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão gênica de P63 através da expressão protéica de p63 e p40 ( $\Delta Np63$ ) e a expressão de p63 mRNA em epitélio adjacente ao tumor, displasia e CEO como forma de verificar sua aplicação como indicador de progressão tumoral;
- Verificar a correlação entre a expressão de p63, p40 e p63 mRNA e as características clínicas e histológicas tumorais, principalmente: infiltrado linfocitário tumoral (TIL), padrão de invasão tumoral, gradação tumoral, invasão vascular, linfática e perineural;
- Verificar a aplicação da expressão das proteínas p63, p40 e de p63 mRNA como indicadores de prognóstico em CEO.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo, sob o processo nº 318/2011, foi integralmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde, Vitória - ES (Apêndice A), aprovado pela Comissão Nacional de Ética em pesquisa (Parecer nº 681/2011) (Apêndice B) e também pelo *National Research Ethics Service* (NRES) - Coventry & Warwickshire (EC.10.H1210.9) (Apêndice C).

### 4.2 CASUÍSTICA

Trata-se de estudo analítico longitudinal prospectivo, no qual foram utilizadas amostras biológicas e dados clínicos de pacientes no atendidos período de Dezembro de 2011 à Dezembro de 2017, no qual os indivíduos foram recrutados para o estudo até 2014 e acompanhados por um período mínimo de 24 meses. Um total de 57 casos foram recrutados no Programa de Prevenção e Detecção Precoce de Câncer de Boca do Hospital Santa Rita de Cássia e no Ambulatório de Cabeça e Pescoço do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) da Universidade Federal do Espírito Santo, ambos no Brasil. Como trata-se de um estudo multicêntrico internacional, 52 pacientes pertencentes ao University Hospitals Coventry and Warwickshire NHS Trust localizado no Reino Unido também foram incluídos nas análises, totalizando 109 indivíduos estudados.

### 4.3 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

Foram atribuídos como critérios de inclusão para o estudo pacientes com diagnóstico conclusivo de carcinoma epidermóide da cavidade bucal (CIDs C02.0 a C06.9), de

ambos os sexos, grupos étnicos e faixa etária, que não haviam sido submetidos a tratamento antineoplásico prévio e que apresentavam blocos e lâminas apresentando mais de 75% da área tecidual total das lâminas representada por tumor.

Como critérios de exclusão foram considerados: lâminas e blocos defeituosos; casos sem seguimento clínico ou com prontuários incompletos; recidivas e casos submetidos a tratamentos prévios como cirurgia, quimioterapia e radioterapia ou com margens cirúrgicas positivas.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS

Os dados referentes às características clínicas como idade, gênero, estadiamento tumoral (TNM), sítio anatômico do tumor, histórico do consumo de álcool e tabaco, informações sobre o tratamento e evolução clínica foram obtidos junto aos prontuários, consulta médica e entrevista. Foram considerados ex-tabagistas e ex-etilistas indivíduos que não possuíam histórico do consumo de tabaco e álcool por no mínimo 12 meses (APÊNDICES D e E).

#### 4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Fragmentos de tecidos tumorais provenientes de biópsia para diagnóstico ou ressecção cirúrgica foram fixados em formalina, emblocados em parafina e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas obtidas foram analisadas e classificadas de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (BARNES et al., 2005). A classificação histopatológica baseou-se no grau de diferenciação em três níveis: tumores bem diferenciados (arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio estratificado escamoso com acentuada queratinização); tumores moderadamente diferenciados (moderado grau de pleomorfismo nuclear, atividade

mitótica aumentada e moderada ceratinização); e tumores pouco diferenciados (predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas e mínima ceratinização).

As displasias foram classificadas em baixo e alto risco de malignização, seguindo os critérios definidos por Kujan e colaboradores, utilizando critérios citológicos e estruturais. Foram consideradas displasias de alto risco quando existiam pelo menos 4 alterações na arquitetura tecidual e pelo menos 5 alterações citológicas (KUJAN et al., 2006).

Adicionalmente foram avaliados os critérios histopatológicos de invasão perineural, linfática e sanguínea; padrão de invasão tumoral e TIL, ambos utilizando lâminas coradas em HE.

Seguindo os critérios estabelecidos pelo *The Royal College of Pathologists* (HIRSCHOWITZ et al., 2010), invasão perineural, linfática e vascular foram consideradas presentes quando as células tumorais puderam ser identificadas no espaço perineural, linfático e vascular, respectivamente.

A classificação do padrão de invasão tumoral foi realizada analisando-se a infiltração das células tumorais no tecido circunjacente. A avaliação do fronte de invasão tumoral seguiu os critérios estabelecidos por Bryne et al. (1992), sendo assim categorizadas em: padrão I, compressivo com bordas infiltrantes bem delineadas; padrão II, margens de progressão tumoral infiltrando como cordões sólidos ou faixas; padrão III, tumor cujas margens infiltrativas contêm grupos pequenos ou cordões de células; e padrão IV, onde o fronte de invasão mostrou marcante dissociação celular em pequenos grupos ou células isoladas.

O TIL foi classificado seguindo os critérios estabelecidos por (MARSH et al., 2011): alto, moderado e baixo. Foi avaliado como alto quando difuso, com presença do infiltrado em mais de 80% do tumor/estroma; moderado, quando desigual, e presente entre 10-80% do tumor/estroma; e baixo, quando fraco ou ausente, presente em menos que 20% do tumor/estroma.



#### 4.6 TISSUE MICROARRAY (TMA)

As lâminas coradas em HE foram digitalizadas pela plataforma *Pannoramic digital slide scanner* (3DHISTECH®, Budapeste, Hungria). As imagens digitalizadas foram então avaliadas pelo sistema de análise de imagens *Pannoramic Viewer* software (versão 1.15 3DHISTECH®, Budapeste, Hungria). Áreas de amostras de tecido representativas do tumor (frente de invasão e porção mediana), displasia e epitélio adjacente ao tumor identificadas foram então selecionadas utilizando a ferramenta para confecção do TMA.

Em seguida, os blocos correspondentes às lâminas selecionadas, denominados blocos doadores, foram inseridos no equipamento TMA Master II (3DHISTECH®, Budapeste, Hungria) para serem digitalizados. As imagens geradas do escaneamento das lâminas, com as áreas previamente selecionadas para confecção do TMA, foram alinhadas às imagens fornecidas pelo escaneamento dos blocos. A partir do alinhamento entre as imagens das lâminas e de seus respectivos blocos, fragmentos cilíndricos de 0,6 mm foram obtidos dos blocos doadores e inseridos em um bloco inicialmente vazio, chamado bloco receptor. Essa transferência de tecidos de regiões selecionadas para o bloco receptor deu-se de forma automatizada, em locais previamente definidos em uma matriz previamente confeccionada, utilizando o equipamento TMA Master II.

A confecção do TMA foi realizada no The Nottingham Health Science Biobank (NHSB), localizado no Reino Unido. Para cada caso e região selecionada (epitélio adjacente ao tumor, displasia, tumor frente e porção mediana) as amostras foram alocadas em triplicata. Posteriormente, os blocos receptores foram seccionados em um micrótomo para a obtenção de cortes histológicos sequenciais de 3 µm de espessura, dispostos em lâminas polarizadas silanizadas lapidadas (StarFrost® Advanced Polycat, Braunschweig, Alemanha).

## 4.7 IMUNOHISTOQUÍMICA

As reações de imunohistoquímica (IHQ) foram realizadas nas lâminas de TMA através de duas reações de IHQ independentes, com emprego de dois anticorpos. Primeiramente foi utilizado anticorpo anti-p63 4A4 (clone VS38c, DAKO, Califórnia, Estados Unidos) direcionado para o core central da proteína p63, que é um anticorpo capaz de identificar todas as isoformas de P63. Outras reações IHQ foram realizadas nas amostras dos mesmo indivíduos utilizando o anticorpo anti-p40 (clone BC28, BIOCARE MEDICALS, Califórnia, EUA), que é um anticorpo que reconhece um epítipo exclusivo de 3 isoformas  $\Delta$ Np63:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$   $\Delta$ Np63 das 6 isoformas existentes (UCHIDA et al., 2015).

### 4.7.1 Imunohistoquímica p63 (Clone VS38c) e p40 - $\Delta$ Np63 (Clone BC28)

As lâminas de TMA foram desparafinizadas em estufa 60° por 1 hora. A reação de IHQ iniciou-se com desparafinização em xilol e reidratação em séries decrescentes de álcool etílico. Para a recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em tampão de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) pH 8,0 em banho-maria, à temperatura de 98°C por 20 minutos e consecutivamente, resfriadas à temperatura ambiente. Para a neutralização da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos, seguido de bloqueio de proteínas com tampão fosfato salino (PBS) adicionado de albumina do soro bovino (BSA) para p63 e de bloqueio de proteínas através de *protein block* do Kit Novolink para p40 (LEICA BIOSYSTEM, Novolink™ Polymer Detection Systems, Wetzlar, Alemanha).

Após estas etapas, as lâminas foram incubadas em temperatura ambiente por 60 minutos com o anticorpo primário monoclonal anti-p63 de camundongo, na diluição 1:50 e incubadas com o sistema de detecção ADVANCE™ HRP em duas etapas de 30 minutos cada (DAKO, Califórnia, EUA).

Nas reações de IHQ com anticorpo anti-p40 as lâminas foram incubadas em temperatura ambiente por 1 hora e 30 minutos com o anticorpo primário monoclonal anti-p40 de camundongo, na diluição 1:100. E seguida, as lâminas foram incubadas com o sistema de detecção pós-primário e polímero do kit Novolink, em duas etapas de 30 minutos cada (LEICA BIOSYSTEM, Novolink™ Polymer Detection Systems, Wetzlar, Alemanha).

A revelação procedeu-se utilizando o 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) à temperatura ambiente por 3 minutos. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina de Harris, por 30 segundos, à temperatura ambiente (HHS80, Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA). Após serem lavadas com água corrente por 10 minutos, as lâminas foram desidratadas com séries crescentes de etanol e emergidas em xilol. A montagem das lâminas se deu com solução de resina não aquosa e recobrimento com lamínula (Entelan® - Merck Millipore, Massachusetts, EUA).

Foram utilizados como controles positivos para p63 fragmentos de tonsila humana e para as análises de p40 fragmentos de bexiga humana. Como controle interno da reação, foi considerada a marcação dos queratinócitos da camada basal. Os controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído por tampão de lavagem (PBS/Triton). A Imunorreatividade obtida foi previamente testada e padronizada.

#### **4.7.2 Análise de expressão protéica**

Para avaliar a expressão de p63 e p40 foi considerada a marcação nuclear em queratinócitos utilizando o método *H-score* (SRIVASTAVA et al., 2015). Este método consiste em uma análise semi-quantitativa obtida pelo produto da intensidade da imunomarcação (variando de 0-3) pela porcentagem de células marcadas em cada nível de intensidade (0 a 100%). Nessa escala, 0, representa ausência de

imunomarcção; 1, imunomarcção de fraca intensidade; 2, imunomarcção de intensidade moderada e 3, imunomarcção de intensidade forte. Todas as secções foram analisadas por 2 examinadores, usando um microscópio de luz (200X) e um consenso foi obtido nos casos discordantes. Em seguida está descrita a fórmula utilizada para obtenção do *H-score*:  $[1 \times (\% \text{ células intensidade } 1+) + 2 \times (\% \text{ células intensidade } 2+) + 3 \times (\% \text{ células intensidade } 3+)]$ .

Avaliou-se a expressão tecidual de p63 e p40 ( $\Delta\text{Np63}$ ) em células tumorais de CEO (fronte e porção mediana), displasia e epitélio adjacente ao tumor. A categorização quanto à alta e baixa expressão de p63 e p40 ocorreu através da instituição do ponto de corte, baseado na mediana de expressão em cada região, obtida pelo cálculo do *H-score* (IACONO et al., 2011). Para p63 as medianas obtidas foram: 132,5 em superfície tumoral; 125,0 em frente de invasão; 15,8 em displasia; 13,3 em epitélio adjacente ao tumor. Para p40 as medianas obtidas foram: 123,3 em superfície tumoral; 280,0 em frente de invasão; 240,0 em displasia; 180,0 em epitélio adjacente ao tumor. A expressão tumoral de p63 nas regiões com *H-score* < 132,5 foi considerada baixa, enquanto o *H-Score*  $\geq$  132,5 foi considerada alta expressão, enquanto expressão de p40 nas regiões com *H-score* < 123,3 foi considerada baixa e o *H-Score*  $\geq$  123,3 foi considerada alta expressão.

#### 4.7.3 Validação TMA

Para a validação do uso de IHQ em TMA foram utilizadas 10 lâminas convencionais contendo tecido tumoral de CEO imunomarcadas com anti-p63 e anti-p40 no qual as avaliações de expressão da proteína foram realizadas por dois patologistas independentes. Não houve diferença significativa inter-observadores entre as leituras realizadas. Em seguida, estes valores de expressão protéica foram comparados com os obtidos da leitura realizada nos TMAs utilizando análise de concordância Kappa, não sendo observada diferença significativa entre leituras efetuadas em lâminas convencionais e lâminas de TMA.

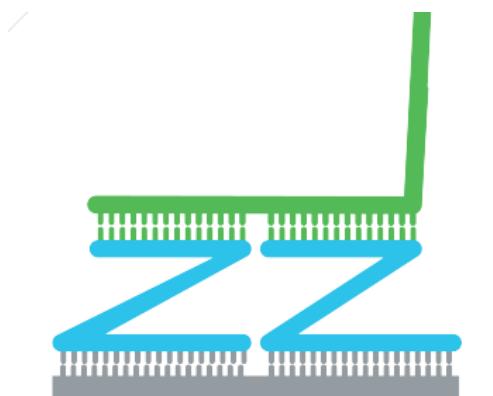
Após validação do método, a utilização do TMA foi adotada pelas vantagens que possui em relação à uniformização das reações, economia de tempo empregado e otimização do uso de anticorpos, reagentes e tecidos.

#### 4.8 HIBRIDIZAÇÃO *IN-SITU* UTILIZANDO SONDAS DE RNA

Técnica de hibridização *in situ* para alvos de RNA foi realizada nas lâminas de TMA por meio da hibridização com sonda Hs-Tp63, desenhada para 209-1174 bp de p63, sequência de acesso: ID NM\_001114982.1, (RNAscope® Technologies, Advanced Cell Diagnosis, Califórnia, EUA). Esta sonda foi desenhada para um domínio comum de p63 e é capaz de identificar todas as isoformas de p63.

Todos os reagentes utilizados para as reações foram oriundos do kit RNAscope® Technologies (RNAscope® Technologies, Advanced Cell Diagnosis, Califórnia, EUA).

Na hibridização pelo RNAscope® duas sondas independentes (sondas duplo Z) têm que se hibridizar com a sequência alvo para que a amplificação do sinal ocorra. Como é altamente improvável que duas sondas independentes hibridem-se com um alvo não específico ao lado do outro, este conceito garante a amplificação seletiva de sinais mais específicos (Figura 9).



**Figura 9** – Hibridização por RNAscope® requer ligação de duas sondas Z. Fonte: ACDBiotechnne.

As reações de hibridização *in situ* iniciaram-se de acordo com as orientações do fabricante com a permeabilização tecidual, que se deu por desparafinização das lâminas de TMA em estufa a 60 °C por 1 hora, seguida de incubação em xilol e etanol 100%. Foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (1-5%), aplicação do RNAscope® Target Retrieval, para recuperação antigênica e aplicação de Protease Plus® para bloqueio de proteínas.

A seguir foi realizada hibridização com a sonda alvo (Hs-Tp63), sonda de controle positivo da reação (Ubiquitina) e sonda de controle negativo (Dapi) no forno de hibridização por 2 horas a 40 °C. Seguiu-se com as amplificações de sinal através da utilização dos Amplificadores (Amp) 1, 2, 3 e 4 à 40°C e utilização dos Amp 5 e 6 em temperatura ambiente.

A detecção do sinal se deu com Brown-A® e Brown-B®, seguido de DAB, contra-coloração com hematoxilina de Harris e montagem a partir de incubação em sequências crescentes de etanol, imersão em xilol e finalmente aplicação de Entelan® e lamínula.

#### **4.8.1 Análise da expressão de p63 mRNA**

A avaliação de expressão de RNA obtida pelas análises do RNAscope® se deu pela utilização de uma guia de pontuação semi-quantitativa (KIM et al., 2013). A expressão de p63 mRNA pode exibir padrão nuclear e/ou citoplasmático, onde o número de pontos corresponde ao número de cópias de RNA, enquanto a intensidade dos pontos reflete o número de pares de sonda ligados a cada molécula. *Score 0*: sem marcação ou < 1 ponto/10 células; *score 1*: 1-3 pontos/célula; *score 2*: 4-9 pontos/célula com *clusters* ausentes ou em pouca quantidade; *score 3*: 10-15 pontos/célula e <10% de pontos em *clusters*; *score 4*: >15 pontos/célula e >10% pontos em *clusters*. Foram considerados baixa expressão os *scores 0* e *1* e alta expressão os *scores 2, 3, 4*. Todos os *scores* foram estabelecidos em magnificação de 200x.

#### 4.9 PROGNÓSTICO

Os pacientes diagnosticados com CEO foram acompanhados por um período de até 5 anos, mediante entrevistas e análise de dados médicos referente aos tratamentos propostos e realizados. O primeiro acompanhamento foi realizado no período de 6 a 18 meses após diagnóstico clínico e final de tratamento de primeira linha; o segundo acompanhamento ocorreu 6 meses após o primeiro acompanhamento e o terceiro e quarto seguimentos ocorreram em 30 e 60 meses após diagnóstico clínico, respectivamente. A avaliação do seguimento foi realizada pela equipe médica e os resultados dos acompanhamentos clínicos foram adicionados em formulários de acompanhamento específicos (APÊNDICE F) e complementados com entrevistas e análises de prontuários.

Para avaliação da progressão tumoral foram levadas em consideração informações concernentes à remissão do tumor, recidiva ou óbito.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram construídas no *software* SPSS® v. 20 e o nível de significância considerado para todos os testes foi de 95%,  $p \leq 0,05$ .

Teste Qui-Quadrado pra independência foi empregado com a finalidade de instituir associações entre as variáveis clinico-patológicas estudadas e com intuito de avaliar a relação entre a expressão de p63, p40 ( $\Delta Np63$ ) e p63 mRNA nas displasias com a ocorrência de displasias de alto ou baixo risco. Foram considerados significantes entrecruzamentos com  $p \leq 0,05$ , nos quais as medidas de associação Phi/ V de Chramer foram maiores que 0,1 e a frequência esperada era maior que 5.

A comparação entre a expressão de p63, p40 ( $\Delta Np63$ ) e de p63 mRNA nas diferentes regiões estudadas foi realizada par a par através do teste de Wilcoxon, visto que as variáveis não seguiam as premissas necessárias para execução do teste paramétrico T pareado ou existiam grupos de comparação com menos de 30 indivíduos.

Para descrever a intensidade da concordância entre as expressões de p63 e da isoforma p40 foi empregado teste de Wilcoxon entre os pares de regiões analisadas. Também foi utilizada a medida Kappa, que é baseada no número de respostas concordantes que seriam esperadas além do acaso, ou seja, no número de casos cujo resultado de alta/baixa expressão seja o mesmo entre p63 e p40. Kappa tem como valor máximo o 1, que representa total concordância. Valor 0 ou valores mais próximos de 0 indicam pouca ou nenhuma concordância e Kappa negativo sugere que a concordância encontrada foi menor do aquela esperada pelo acaso.

Para estabelecer as curvas de sobrevida global (SG) foi considerado como ponto inicial o dia do diagnóstico clínico e ponto final o dia em que o desfecho ocorreu, ou seja, o óbito para SG. Para as curvas de sobrevida livre de doença (SLD) foi considerado como ponto inicial a data do término do tratamento de primeira linha e ponto final o dia em que o desfecho ocorreu, ou seja, a recidiva. Para os casos nos quais não se sucedeu o desfecho, o dia do retorno ou última data conhecida por estar vivo foi considerada.

As curvas de sobrevida foram obtidas por intermédio do modelo de Kaplan-Meier com índice de confiança igual a 95%. As variáveis significantes que possuíam proporcionalidade entre os riscos nas análises de Kaplan-Meier foram analisadas através de modelo de riscos proporcionais de Cox. Esta corresponde a uma análise de regressão múltipla aplicada na análise de sobrevida, indicada para estimar o papel das variáveis independentes que agem multiplicativamente sobre o risco, permitindo identificar quais variáveis agem de maneira intensificadora, quando analisadas em conjunto.

Quando as curvas se cruzam nas análises de sobrevivência realizada pelo modelo Kaplan-Meier, há uma quebra do pré-requisito de proporcionalidade dos riscos que



Cox assume. Dessa maneira, a regressão de Cox não foi utilizada nesses casos, assumindo os resultados encontrados via Kaplan-Meier.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Cento e nove indivíduos com CEO atendidos nos serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço entre os anos de 2011 e 2017 foram incluídos neste estudo. Observou-se predomínio do sexo masculino (78,0%) e de indivíduos com idade igual ou inferior a 60 anos (51,4%), com média de idade da população de 60,49 anos (Mínimo: 32 anos; Máximo: 98 anos). Cinquenta indivíduos (58,1%) apresentavam hábito tabagista, dos quais 88% eram homens e 22 indivíduos (25,6%) eram ex-tabagistas, dos quais 86,4% eram homens. Quarenta e quatro indivíduos (57,9%) eram etilistas e 19 (25,0%) ex-etilistas, destes 86,4% e 84,2% eram homens respectivamente. Quarenta e dois indivíduos (52,5%) consumiam tabaco e álcool concomitantemente.

A língua foi o sítio anatômico mais frequentemente acometido (69,7%), seguido do assoalho bucal (11,0%). Em relação ao tamanho do tumor, 39,4% indivíduos apresentavam tamanho do tumor T4 e 37,6% apresentavam metástases em linfonodos regionais. Ao diagnóstico, 52,0% dos indivíduos incluídos no estudo apresentavam estadio avançado da doença (IV), enquanto 32,1% tiveram recidiva da doença e 46,8% evoluíram ao óbito. As características clínico-patológicas da população analisada encontram-se descritas na tabela 1.

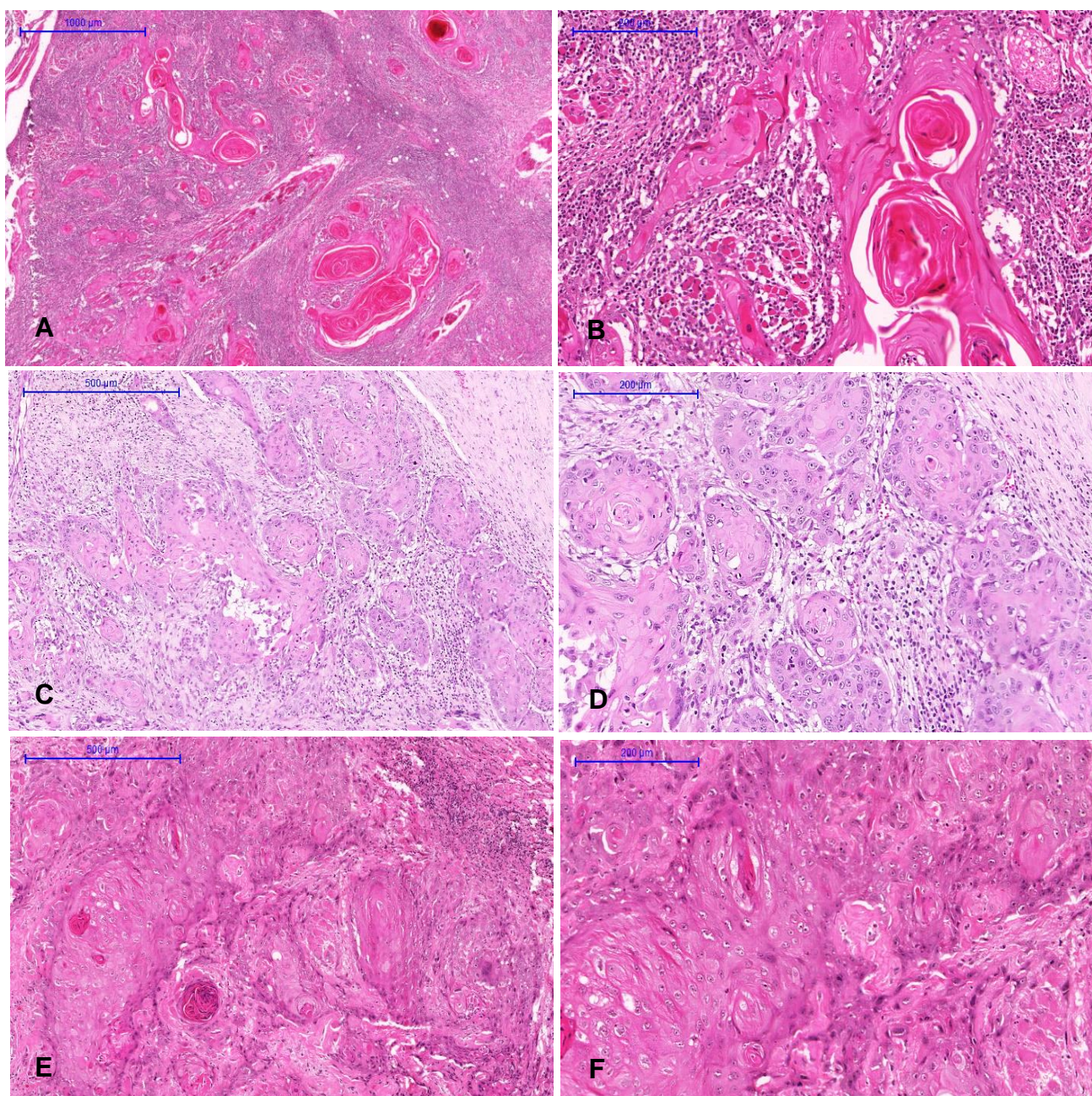
**Tabela 1** - Características clínico-patológicas dos indivíduos com CEO (n=109).

<b>Características Clínico-patológicas</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	85	78,0
Feminino	24	22,0
<b>Idade (anos)</b>		
≤ 60 anos	56	51,4
<b>Tabagismo<sup>a</sup></b>		
Tabagista	50	58,1
Ex-tabagista	22	25,6
Nunca	14	16,3
<b>Etilismo<sup>a</sup></b>		
Etilista	44	57,9
Ex-etilista	19	25,0
Nunca	13	17,1
<b>Sítio Anatômico</b>		
Língua	76	69,7
Assoalho bucal	12	11,0
Gengiva	7	6,4
Área retromolar	6	5,5
Mucosa jugal	3	2,8
Palato	2	1,8
Vestíbulo bucal	1	0,9
<b>Tamanho do tumor primário<sup>a</sup></b>		
T1	16	15,4
T2	41	39,4
T3	6	5,8
T4	41	39,4
<b>Metástase linfonodal<sup>a</sup></b>		
N0	57	58,2
N+	41	41,8
<b>Estadiamento<sup>a</sup></b>		
I	11	11,2
II	27	27,6
III	9	9,2
IV	51	52,0

<sup>a</sup>Não informados: Tabagismo (n=23); Etilismo (n=33); Tamanho tumor primário (T) (n=5); Metástase linfonodal (n=11); Estadiamento (n=11). N0: ausência de metástase linfonodal; N+: presença de metástase linfonodal.

A figura 10 ilustra as gradações encontradas seguindo a classificação dos tumores da Organização Mundial da Saúde (BARNES et al., 2005). A maioria das amostras

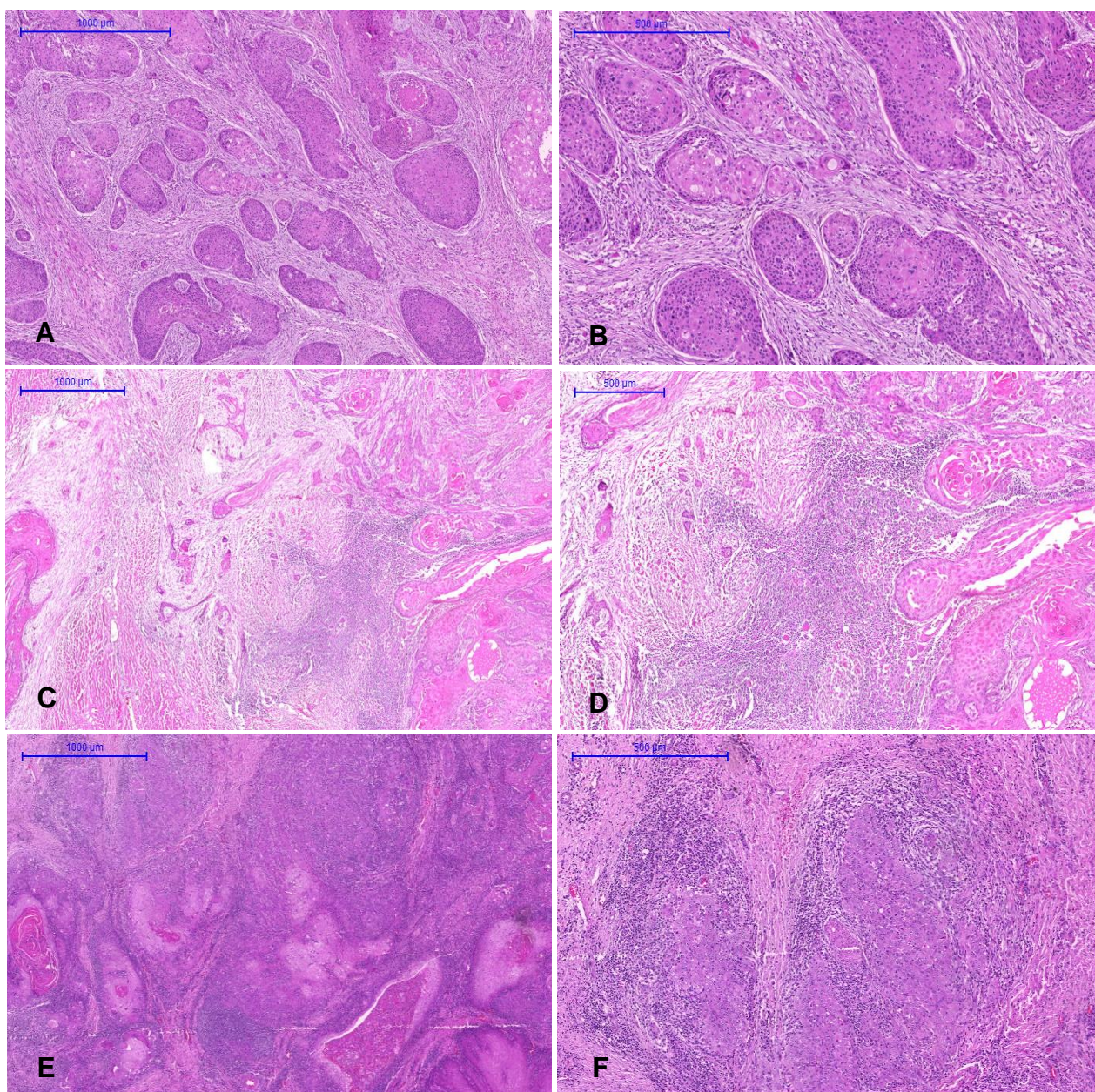
analisadas era constituída por tumores moderadamente diferenciados (57,1%), enquanto 36,4% exibiram tumores bem diferenciados e a minoria, tumores pouco diferenciados (6,5%).



**Figura 10** – Fotomicrografia representativa da gradação tumoral em CEO, seguindo os critérios da OMS. (A,B) tumor bem diferenciado; (C,D) tumor moderadamente diferenciado; (E,F) tumor pouco diferenciado. Coloração HE. Magnificação original A, C, E 100x e B, D, F 200x.



O padrão de invasão linfocitária no tecido tumoral está retratado na figura 11 e foi categorizado em baixo, moderado e alto de acordo com a quantidade de linfócitos presentes na região peri e intratumoral. Um reduzido número de linfócitos infiltrantes foi encontrado em 24,5% dos tumores, enquanto quantidade moderada e alta foram observadas em 56,6% e 18,9% dos tumores analisados, respectivamente (MARSH et al., 2011).

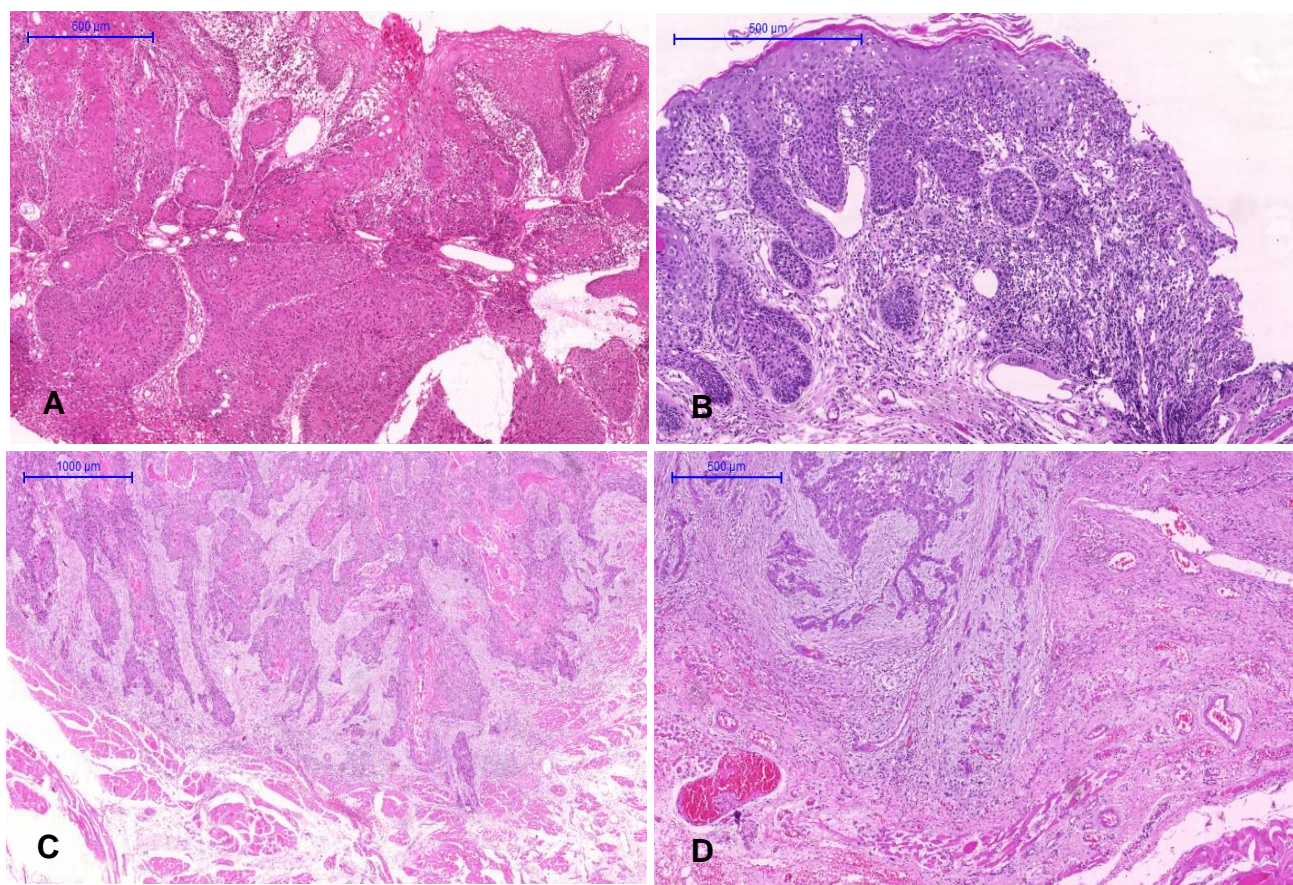


**Figura 11** – Fotomicrografia ilustrativa do padrão de infiltração linfocitária tumoral em CEO. (A, B) Baixo infiltrado linfocitário; (C,D) Moderado infiltrado linfocitário; (E,F) Elevado infiltrado linfocitário. Coloração HE. Magnificação original A, C, E 200x e B, D, F 500x.



Baixa quantidade de linfócitos infiltrantes foi observada em tabagistas ( $p=0,044$ ). Já, elevada presença de linfócitos infiltrantes no tumor foram associadas com tamanhos de tumor menores (T1/T2) e estadiamentos iniciais (I/II) ( $p=0,001$  e  $p=0,001$ , respectivamente) (Tabela 2).

A figura 12 apresenta os diferentes padrões de invasão tumoral, conforme estabelecido por Bryne e colaboradores (BRYNE et al., 1992). O padrão com maior ocorrência na população estudada foi o padrão III (43,6%), representado por pequenos grupos ou cordões de células infiltrantes, seguido do tipo IV (39,7%) no qual há marcante dissociação em grupos pequenos ou células individuais. Os padrões menos frequentes foram o tipo II (9,0%) que tem caráter infiltrante, com cordões sólidos de células infiltrantes e o tipo I (7,7%), compressivo e com bordas bem delineadas.

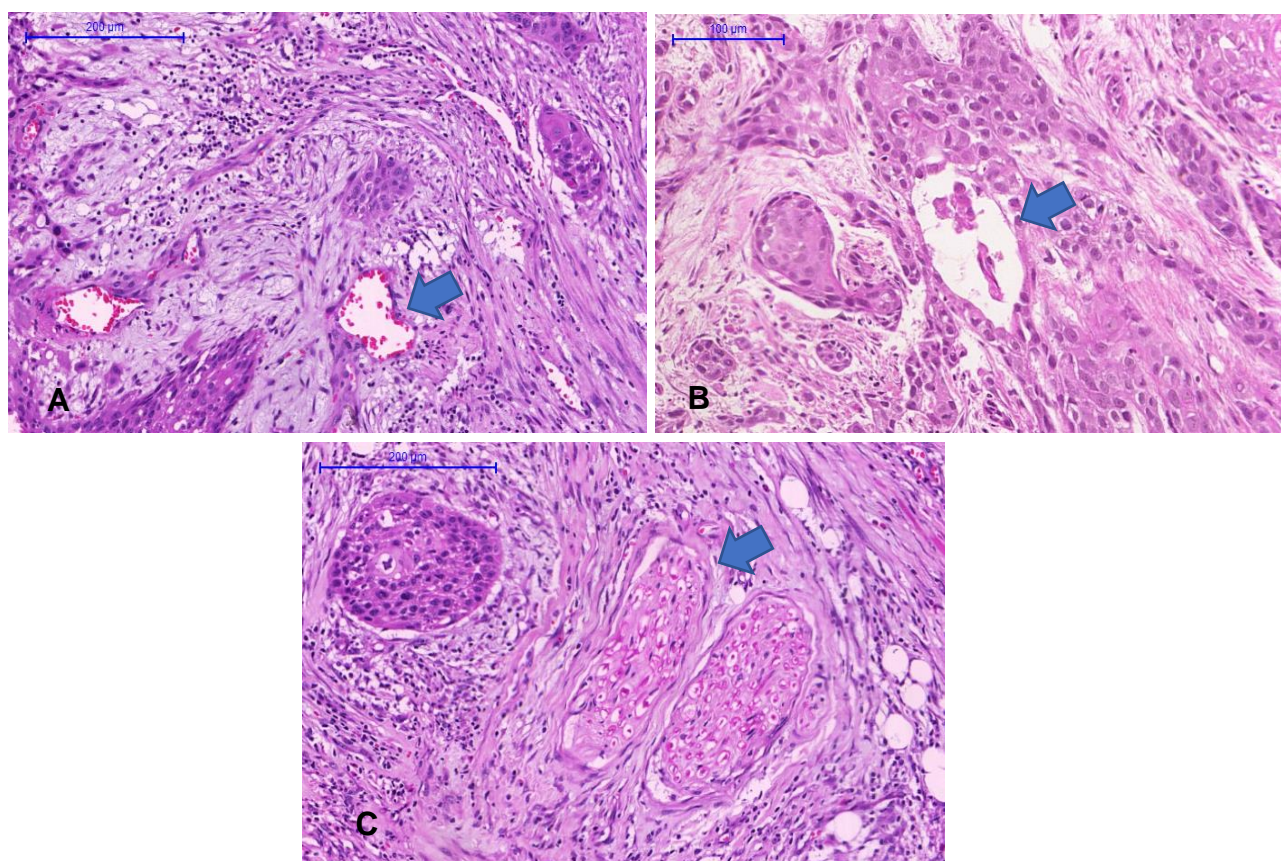


**Figura 12** – Fotomicrografia de CEO representando o padrão de invasão tumoral conforme proposto por Bryne et al 1992. (A) Padrão de invasão tipo I; (B) Padrão de invasão tipo II; (C) Padrão de invasão tipo III; (D) Padrão de invasão tipo IV. Coloração HE. Magnificação original 200x e 500x.



A presença do hábito de fumar mostrou associação com padrões de invasão tumoral dos tipos III e IV, no qual as células, ou grupo de células apresentam gradualmente maior dissociação ( $p=0,032$ ) (Tabela 2).

Foram observadas invasão vascular em 83,8% dos casos de CEO analisados, invasão perineural em 66,7% enquanto 43,6% apresentavam invasão linfática. As invasões: vascular (A), linfática (B), e perineural (C) por células neoplásicas em CEO estão indicadas na figura 13. A ocorrência de invasão vascular mostrou associação com o consumo de álcool, sendo que indivíduos etilistas ou ex-etilistas apresentavam mais invasão vascular que os não etilistas ( $p=0,015$ ) (Tabela 2).



**Figura 13** – Fotomicrografia mostrando os diferentes tipos de invasão tumoral. (A) Invasão vascular; (B) Invasão linfática; (C) Invasão perineural. Coloração HE. Magnificação original 1000x.

Associações entre os parâmetros de infiltração linforcitária tumoral, padrão de invasão tumoral, invasão vascular e as variáveis clínico-patológicas estudadas estão descritas na tabela 2. Não foi observada associação significativa entre as variáveis clínico-patológicas e os parâmetros de gradação tumoral, invasão linfática e perineural analisadas (tabela 2).



**Tabela 2** – Associação entre as variáveis: gradação tumoral, infiltração linfocitária tumoral, padrão de invasão, invasão linfática, vascular e perineural com as características clínico-patológicas dos indivíduos acometidos por CEO.

Variáveis	Gradação tumoral				TIL				Padrão de invasão					Invasão linfática			Invasão vascular			Invasão perineural		
	Pou-co	Mode-rado	Bem	p	Baixa	Mode-rada	Alta	p	I	II	III	IV	p	Sim	Não	p	Sim	Não	p	Sim	Não	p
Consumo de tabaco																						
Tabagista	4	25	20	0,547	16	26	6	0,044*	2	3	15	15	0,032*	17	14	0,759	34	8	0,916	3	3	0,727
Nunca	1	10	3		0	10	4		0	3	6	1		3	5		11	2		1	0	
Ex-tabagista	2	9	10		5	10	6		4	0	5	7		8	8		19	3		3	1	
Consumo de álcool																						
Etilista	2	26	16	0,404	12	23	8	0,187	1	1	13	13	0,358	19	13	0,231	32	7	0,015*	4	2	0,545
Nunca	0	7	6		1	11	1		2	2	3	4		3	5		8	5		2	0	
Ex-etilista	3	8	6		7	7	3		2	1	4	6		3	7		17	0		1	2	

**Tabela 2** - Associação entre as variáveis: gradação tumoral, infiltração linfocitária, padrão de invasão, invasão linfática, de vasos sanguíneos e perineural com características clínico-patológicas dos indivíduos acometidos por CEO.

Variáveis	Gradação tumoral				TIL				Padrão de invasão				Invasão linfática			Invasão vascular			Invasão perineural			
	Pou-co	Mode-rado	Bem	<i>p</i>	Baixa	Mode-rada	Alta	<i>p</i>	I	II	III	IV	<i>p</i>	Sim	Não	<i>p</i>	Sim	Não	<i>p</i>	Sim	Não	<i>p</i>
Tamanho tumor primário																						
T1/T2	4	30	21	0,776	8	29	16	0,001	3	7	15	14	0,060	16	28	0,113	46	8	0,508	5	3	1,000
T3/T4	3	29	15		16	30	2	*	3	0	16	16		16	13		32	8		3	1	
Metás-tase linfonodal																						
N0	5	31	25	0,125	13	34	13	0,398	3	6	21	16	0,247	20	23	0,906	45	11	0,594	7	4	1,000
N+	2	26	8		10	22	4		3	1	7	13		12	13		28	5		1	0	
Estadia-mento																						
I/II	3	21	18	0,407	5	23	12	0,011	2	6	14	9	0,056	10	22	0,056	36	6	0,526	3	3	0,545
III/IV	4	38	18		19	36	6	*	4	1	17	21		22	19		42	10		5	1	

Teste Qui-quadrado. \*p ≤ 0,05

## 5.2 EXPRESSÃO DE p63

O padrão de expressão de p63 nas regiões de epitélio adjacente ao tumor e tecidos displásicos apresenta-se usualmente na camada basal epitelial, podendo atingir camadas parabasais, principalmente nas displasias de alto grau.

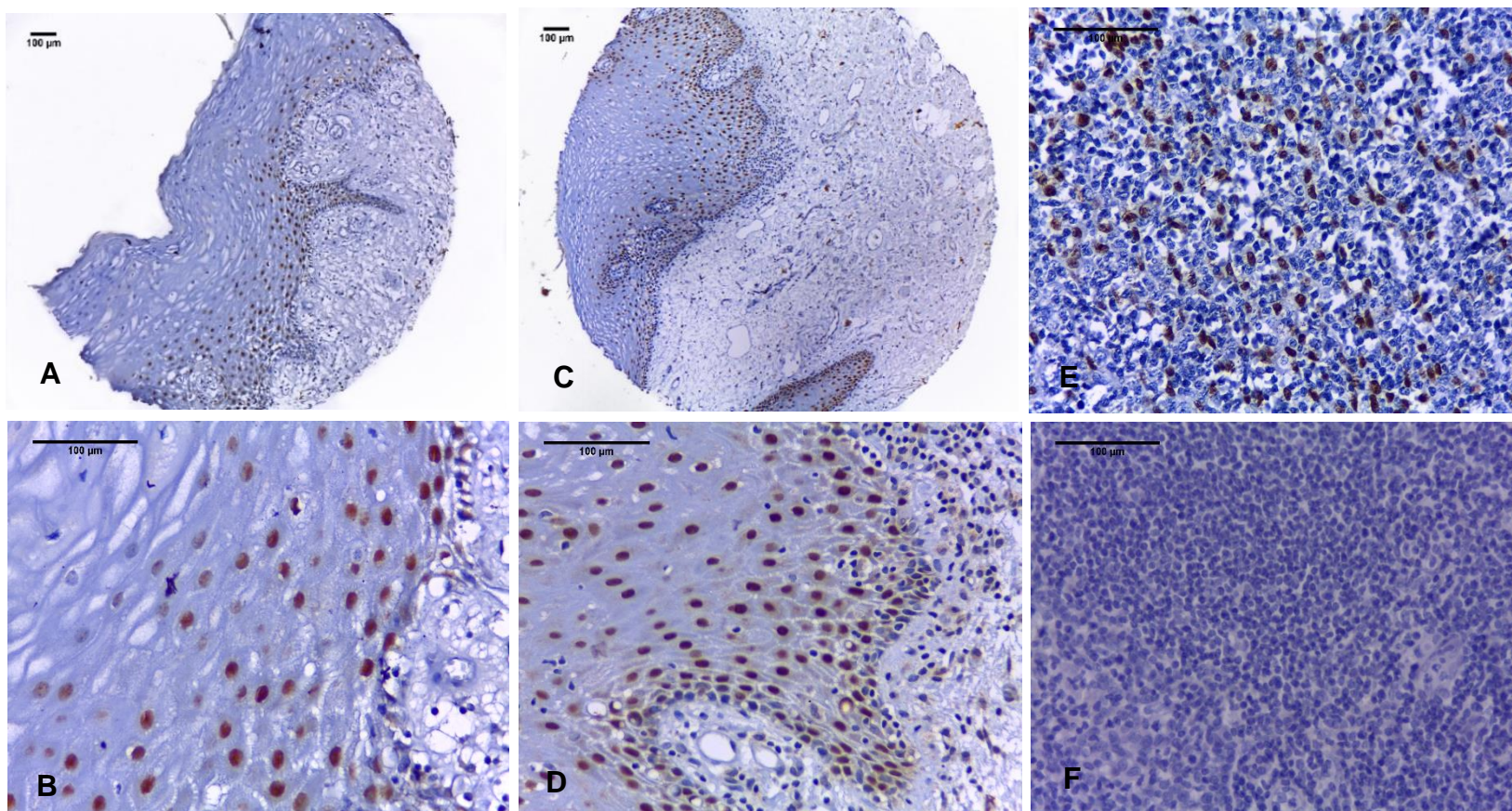
No tecido tumoral, tanto nas regiões centrais da massa tumoral quanto no fronte de invasão a expressão de p63 foi predominantemente de expressão elevada. Alta expressão de p63 foi encontrada em 56,1% dos tumores analisados e em 53,1% dos casos na região do fronte de invasão tumoral. Nas displasias e no epitélio adjacente ao tumor a expressão de p63 também foi alta, com 54,3% e 51,5% dos casos analisados, respectivamente (Tabela 3). Ao longo das análises foi detectada redução de material disponível para análises devido à perda de cores do TMA, o que justifica diminuição do número inicial (n) de cada região.

**Tabela 3** - Expressão de p63 em epitélio adjacente ao tumor, displasia e tecido tumoral.

Expressão p63	Epitélio adjacente ao tumor		Displasia		Tumor (centro)		Tumor (frente)	
	n=45	%	n=46	%	n=98	%	n=32	%
<b>Alta</b>	23	51,1	25	54,3	55	56,1	17	53,1
<b>Baixa</b>	22	48,9	21	45,7	43	43,9	15	46,9

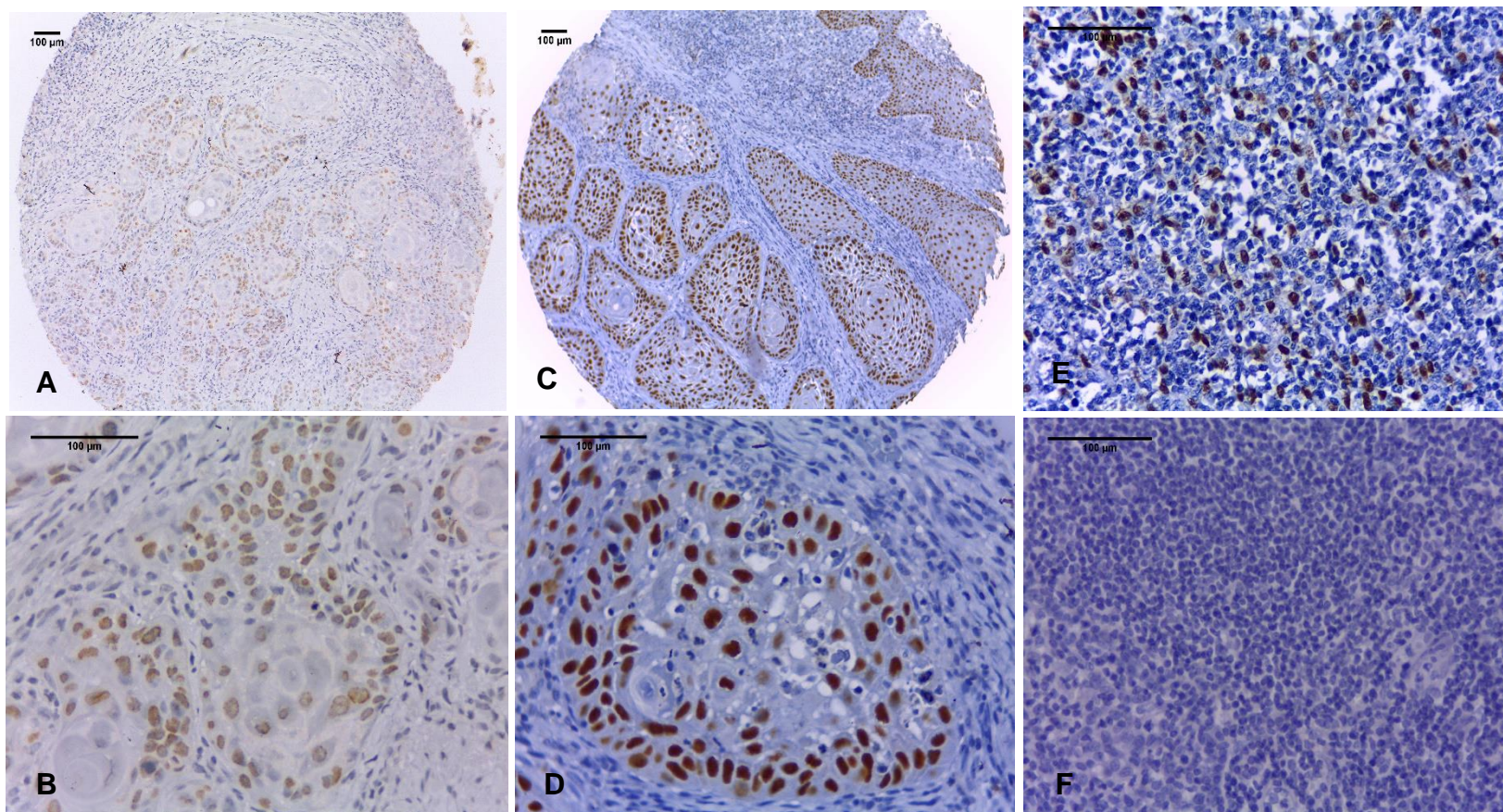
<sup>a</sup>Não avaliados: Epitélio (n=64); Displasia (n=63); Superfície tumoral (n=13); Fronte de invasão (n=77).

O padrão de imunomarcção de p63 nas regiões do epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor (região central do tumor e fronte de invasão tumoral), assim como os controles positivo e negativo da reação estão exemplificados nas Figuras 14 e 15.



**Figura 14** – Expressão de p63 em CEO. (A, B) Imunomarcção de intensidade forte nas camadas basal e para-basal de epitélio adjacente ao tumor; (C, D) Imunomarcção de intensidade forte em displasia de baixo risco; (E) Controle positivo tonsila; (F) Controle negativo tonsila, omissão do anticorpo primário. Magnificações originais de 100x (A, C) e 400x (B, D, E, F).





**Figura 15** - Expressão de p63 em CEO. (A,B) Imunomarcação de intensidade fraca em superfície tumoral; (C, D) Imunomarcação de intensidade forte em frente de invasão; (E) Controle positivo tonsila; (F) Controle negativo tonsila, omissão do anticorpo primário. Magnificações originais de 100x (A, C) e 400x (B, D, E, F).

Foi avaliado se elevada expressão de p63 poderia estar relacionada com a ocorrência de displasias de alto grau. Não observamos associação significativa entre a expressão de p63 e o grau de displasia ( $p=0,315$ ), conforme mostrado na tabela 4.

**Tabela 4** – Associação entre expressão de p63 e grau de displasia (n=44).

Expressão p63 displasia	Displasia Baixo risco		Displasia Alto risco		<i>p</i>
	n=27	%	n=17	%	
<b>Alta</b>	16	36,4	8	18,2	0,315
<b>Baixa</b>	11	25,0	9	20,4	

Teste Qui-quadrado para independência. Ausentes: n=65. \* $p \leq 0,05$ .

Na Tabela 5 é possível observar a participação da expressão de p63 na progressão tumoral. A expressão de p63 nos tumores foi maior que a expressão nas displasias ( $p=0,001$ ) e que no epitélio adjacente ao tumor ( $p=0,003$ ) conforme mostrado na tabela 5. Por outro lado, a expressão de p63 no epitélio não diferiu estatisticamente de sua expressão nas displasias ( $p=0,651$ ).

**Tabela 5** - Expressão de p63 e a progressão tumoral. Análise entre os pares de segmentos epitélio adjacente ao tumor/displasia, displasia/tumor e epitélio e tumor.

Regiões	n	Média H-score	Desvio padrão	<i>p</i>
Epitélio	45	62,73	86,924	0,651
Displasia	46	63,09	87,015	
Displasia	46	63,09	87,015	0,001*
Tumor	96	143,39	99,385	
Epitélio	45	62,73	86,924	0,003*
Tumor	96	143,39	99,385	

<sup>a</sup>Não avaliados: Tumor (n=13); Displasia (n=63); Epitélio (n=64). Teste Wilcoxon: \* $p \leq 0,05$ .

As associações entre a expressão nuclear de p63 e as variáveis clínico-patológicas estudadas estão representadas na tabela 6. Os resultados mostraram associação entre a elevada expressão de p63 no tecido tumoral e idade avançada ( $p=0,046$ ), e alta expressão de p63 em tamanho de tumores maiores, T3 e T4 ( $p=0,001$ ). Associação significativa também foi observada entre a expressão de p63 aumentada no fronte de invasão e tabagismo ( $p=0,031$ ).

**Tabela 6** – Associação entre a expressão de p63 e as variáveis clínico-patológicas (n=109).

Variáveis	Tumor			Fronte de invasão		
	baixa	alta	<i>p</i>	baixa	alta	<i>p</i>
<b>Gênero</b>						
Masculino	33	43	0,527	14	11	0,061
Feminino	10	12		1	6	
<b>Idade (anos)</b>						
≤ 60 anos	27	24	0,046*	10	8	0,225
> 60 anos	16	31		5	9	
<b>Tabagismo</b>						
Sim	16	27	0,671	5	6	0,031*
Nunca	7	7		1	5	
Ex-tabagista	7	12		6	1	
<b>Etilismo</b>						
Sim	15	22	0,558	7	6	0,175
Nunca	4	6		2	0	
Ex-etilista	5	14		2	4	
<b>Tamanho do tumor</b>						
T1/T2	31	22	0,001*	9	12	0,529
T3/T4	10	32		6	5	
<b>Metástase Linfonodal</b>						
N+	14	20	0,516	5	6	0,809
N0	22	34		10	10	
<b>Estadiamento</b>						
I/II	20	20	0,174	7	8	0,982
III/IV	21	34		8	9	

\* Teste Qui Quadrado,  $p \leq 0,05$

A correlação entre a expressão de p63 e as variáveis histopatológicas estão representadas na tabela 7. As variáveis descritas não mostraram associação significativa com a expressão da proteína no tumor e frente de invasão.

**Tabela 7** - Associações entre a expressão de p63 e as variáveis histopatológicas (n=109).

Variáveis	Tumor			Frente de invasão		
	baixa	alta	<i>p</i>	baixa	alta	<i>p</i>
Gradação tumoral						
Bem	14	20	0,849	5	5	0,266
Moderadamente	26	29		10	10	
Pouco	3	4		0	2	
TIL						
Baixo	12	10	0,106	4	3	0,733
Moderado	19	36		6	9	
Alto	11	8		5	5	
Padrão de invasão						
I	2	2	0,677	1	0	0,129
II	2	5		0	2	
III	15	15		1	4	
IV	11	18		5	4	
Invasão vascular						
Sim	32	42	0,817	11	14	0,241
Não	6	9		3	1	
Invasão linfática						
Sim	13	17	0,387	5	7	0,821
Não	21	18		6	7	
Invasão perineural						
Sim	18	11	0,79	7	6	0,696
Não	6	11		5	3	

\* Teste Qui-Quadrado, \* $p \leq 0,05$



### 5.3 EXPRESSÃO DE p40

Nas regiões de tumor (superfície e frente de invasão), nas displasias e nos epitélios adjacentes a tumores estudados, a expressão de p40 foi predominantemente elevada. Expressão alta da proteína foi encontrada em 53,8% dos casos de superfície tumoral analisados, 55,2% do frente de invasão, 53,7% dos casos de displasias e 52,6% dos epitélios adjacentes a tumores (Tabela 8).

**Tabela 8** - Expressão de p40 em epitélio normal, displasia e tecido tumoral.

Expressão p40	Epitélio adjacente ao tumor		Displasia		Tumor (superfície)		Tumor (frente)	
	n=38	%	n=41	%	n=93	%	n=29	%
<b>Alta</b>	20	52,6	22	53,7	50	53,8	16	55,2
<b>Baixa</b>	18	47,4	19	46,3	43	46,2	13	44,8

A Tabela 9 descreve a comparação entre a expressão de p40 nas diferentes regiões avaliadas. Foi observada diferença quanto a expressão de p40 entre displasia e tumor ( $p<0,001$ ) e epitélio e tumor ( $p=0,035$ ).

**Tabela 9** - Comparação entre a expressão de p40 entre os pares de segmentos epitélio/displasia, displasia/tumor e epitélio/tumor.

Regiões	n	Média	Desvio padrão	p
Epitélio	38	172,61	85,885	0,276
Displasia	41	222,10	64,774	
Displasia	41	222,10	64,774	<0,001*
Tumor	92	141,84	94,146	
Epitélio	38	172,61	85,885	0,035*
Tumor	92	141,84	94,146	

Teste Wilcoxon: \* $p\leq 0,05$ .

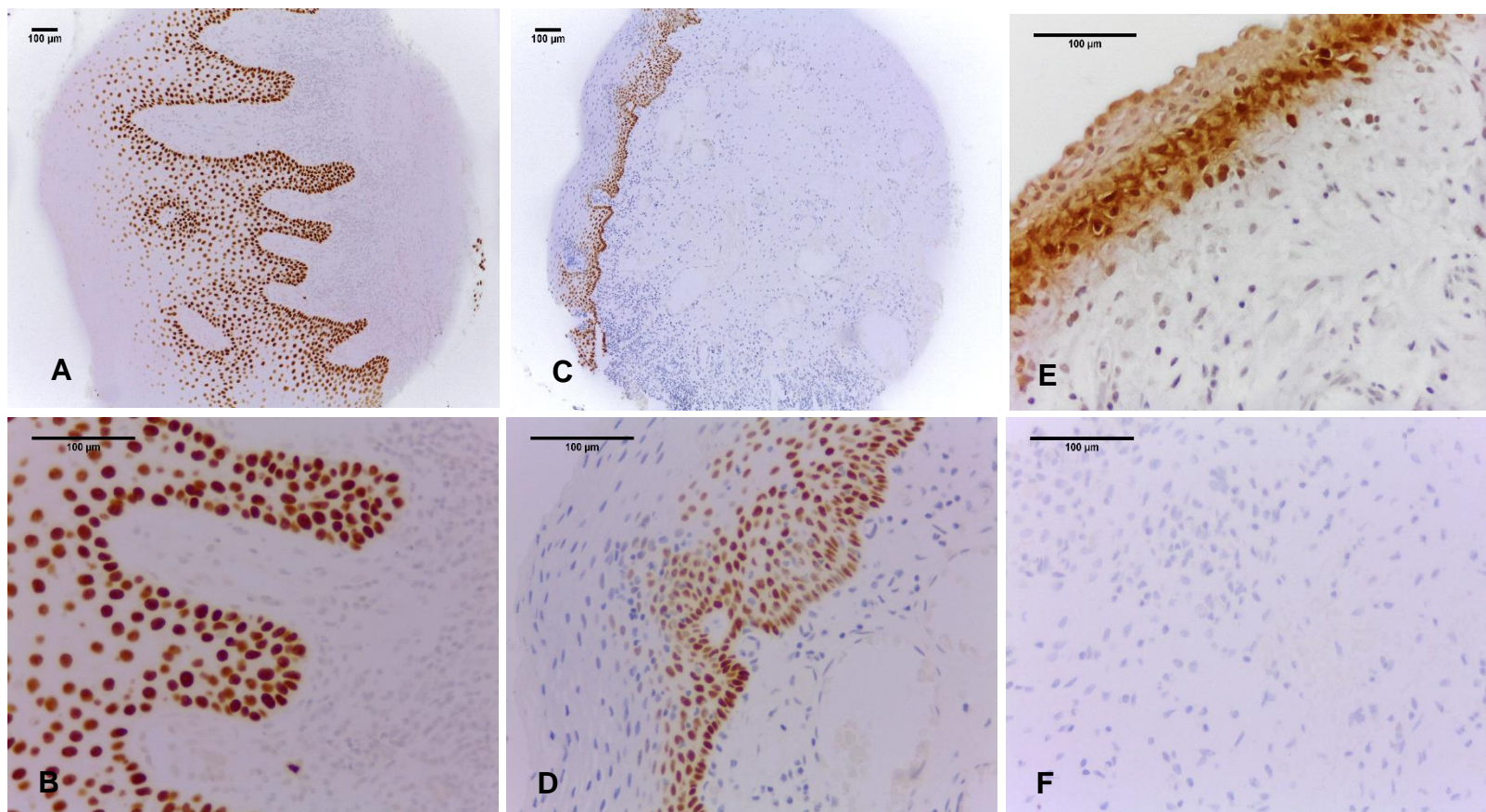
Também foi estudada se a elevada expressão de p40 estava associada com ocorrência de displasias de alto grau. Observamos diferença significativa entre a expressão de p40 e o grau de displasia ( $p=0,022$ ), no qual displasias de alto risco de transformação maligna apresentaram alta expressão de p40, conforme mostrado na tabela 10.

**Tabela 10** – Associação entre expressão de p40 e o grau de displasia (n=39).

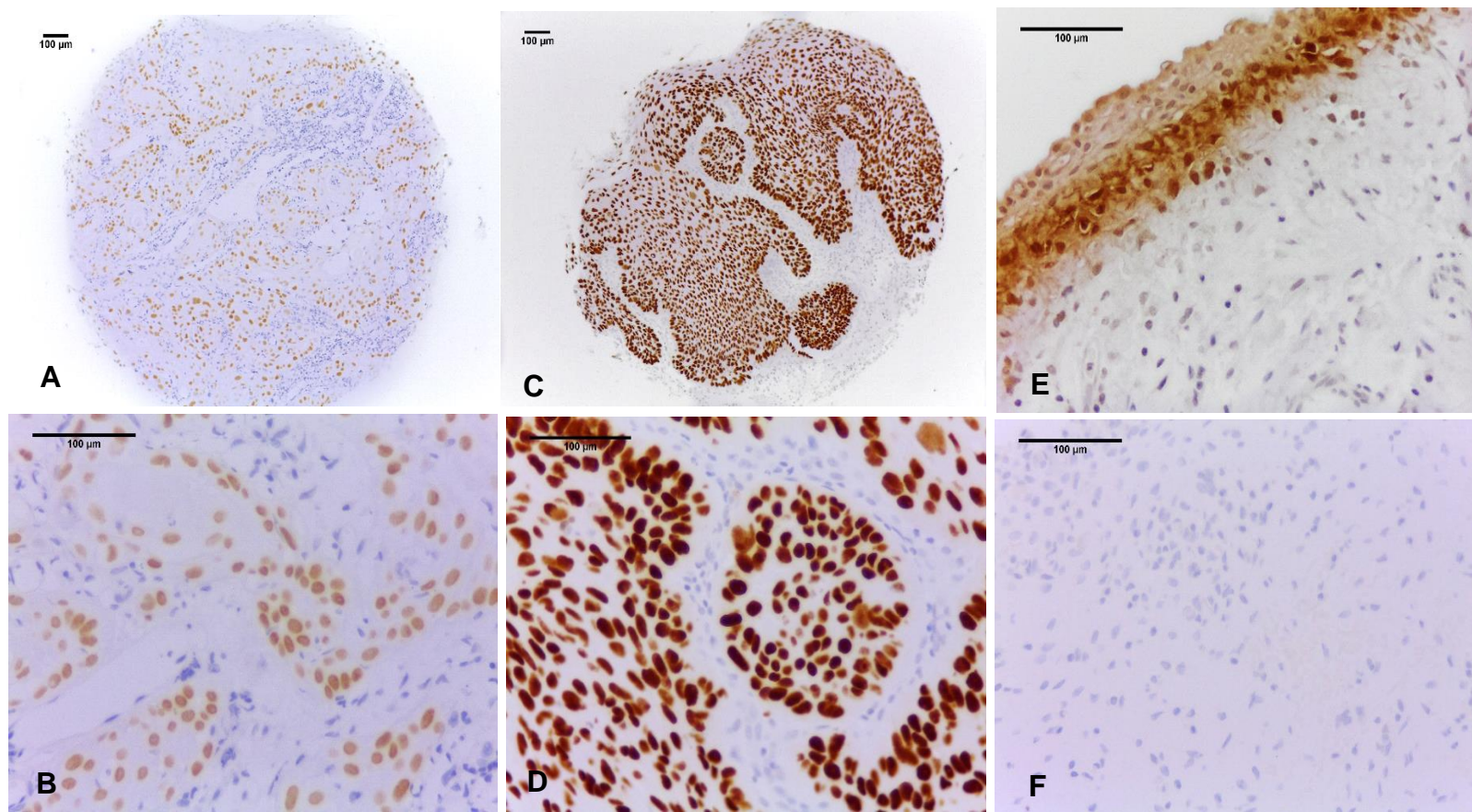
Expressão p40 displasia	Displasia Baixo risco		Displasia Alto risco		<i>p</i>
	n= 25	%	n=14	%	
<b>Alta</b>	10	25,6	11	28,2	0,022*
<b>Baixa</b>	15	38,5	3	7,7	

Teste Qui-quadrado para independência. Ausentes: n=70. \* $p \leq 0,05$ .

O padrão de expressão de p40 segue o encontrado em p63, visto que o mesmo corresponde às isoformas  $\Delta N$  de p63. A expressão observada em p40 nas regiões do epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor, assim como os controles positivo e negativo estão exemplificados nas Figuras 16 e 17.



**Figura 16** - Expressão de p40 em CEO. (A, B) Imunomarcacão de intensidade forte nas camadas basal e para-basal de epitélio adjacente ao tumor; (C, D) Imunomarcacão de intensidade forte em displasia de baixo risco; (E) Controle positivo bexiga; (F) Controle negativo bexiga, omissão do anticorpo primário. Magnificações originais de 100x (A, C) e 400x (B, D, E, F).



**Figura 17** - Expressão de p40 em CEO. (A, B) Imunomarcacão de intensidade fraca em tumor (superfície tumoral); (C, D) Imunomarcacão de intensidade forte em tumor (superfície tumoral); (E) Controle positivo bexiga; (F) Controle negativo bexiga, omissão do anticorpo primário. Magnificações originais de 100x (A, C) e 400x (B, D, E, F).

As associações entre a expressão nuclear de p40 e as variáveis clínico-patológicas estudadas estão representadas na tabela 11. Os resultados mostraram associação significativa entre a elevada expressão de p40 no fronte de invasão com o tabagismo ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 11** - Associações entre a expressão de p40 e as variáveis clínico-patológicas (n=109).

Variáveis	Superfície tumoral			Fronte de invasão		
	baixa	alta	<i>p</i>	baixa	alta	<i>p</i>
<b>Gênero</b>						
Masculino	34	37	0,566	12	11	0,104
Feminino	9	13		1	5	
<b>Idade (anos)</b>						
≤ 60 anos	22	27	0,785	9	7	0,170
> 60 anos	21	23		4	9	
<b>Tabagismo</b>						
Sim	20	21	0,553	5	6	<0,001*
Nunca	8	6		0	6	
Ex-tabagista	6	10		6	0	
<b>Etilismo</b>						
Sim	19	17	0,222	6	7	0,870
Nunca	4	6		1	1	
Ex-etilista	4	11		3	2	
<b>Tamanho do tumor</b>						
T1/T2	24	16	0,848	9	11	0,978
T3/T4	29	21		4	5	
<b>Metástase Linfonodal</b>						
N+	11	20	0,419	2	7	0,070
N0	24	30		11	8	
<b>Estadio</b>						
I/II	20	20	0,343	8	6	0,198
III/IV	20	30		5	10	

\* Teste Qui-Quadrado, \* $p \leq 0,05$ .

A correlação entre a expressão nuclear de p40 e as variáveis histopatológicas estão representadas na tabela 12. A elevada expressão de p40 na superfície tumoral mostrou associação com tumores pouco diferenciados ( $p=0,010$ ) e com a presença de invasão de células tumorais nos vasos linfáticos ( $p=0,022$ ).

**Tabela 12** - Associações entre a expressão de p40 e as variáveis histopatológicas (n=109).

Variáveis	Superfície tumoral			Frente de invasão		
	baixa	alta	<i>p</i>	baixa	alta	<i>p</i>
Gradação tumoral						
Bem	20	15	0,010*	7	3	0,116
Moderadamente	23	28		5	12	
Pouco	0	6		1	1	
TIL						
Baixo	6	14	0,199	3	4	0,725
Moderado	25	27		5	8	
Alto	11	8		5	4	
Padrão de invasão						
I	1	4	0,493	1	0	0,250
II	3	4		0	2	
III	17	14		2	3	
IV	13	12		4	4	
Invasão v. sanguíneos						
Sim	32	39	0,519	9	13	0,203
Não	5	9		3	1	
Invasão linfática						
Sim	9	20	0,022*	7	4	0,392
Não	22	15		5	6	
Invasão perineural						
Sim	13	14	0,497	6	7	0,639
Não	6	10		4	3	

\* Teste Qui-Quadrado, \* $p \leq 0,05$



#### 5.4 EXPRESSÃO DE p63 mRNA

Em todas as regiões avaliadas (tumor, displasia e epitélio adjacente ao tumor) a expressão de p63 mRNA foi majoritariamente elevada. A tabela 13 mostra a expressão em cada região considerada.

**Tabela 13** - Expressão de p63 mRNA em epitélio normal, displasia e tecido tumoral.

Expressão p63 mRNA	Epitélio		Displasia		Tumor	
	n=42	%	n=47	%	n=93	%
<b>Alta</b>	23	54,8	30	63,8	53	57,0
<b>Baixa</b>	19	45,2	17	36,2	40	43,0

A Tabela 14 descreve a comparação entre a expressão de p63 mRNA nas diferentes regiões avaliadas. Não foi observada diferença quanto a expressão de p63 mRNA entre tumor, displasia e epitélio adjacente ao tumor.

**Tabela 14** - Comparação entre a expressão de p63 mRNA entre os pares de segmentos epitélio/displasia, displasia/tumor e epitélio/tumor.

Regiões	n	Média	Desvio padrão	p
Epitélio	42	1,55	0,504	0,109
Displasia	47	1,64	0,486	
Displasia	47	1,64	0,486	0,835
Tumor	93	1,57	0,498	
Epitélio	42	1,55	0,504	0,317
Tumor	93	1,57	0,498	

Teste Wilcoxon: \*p≤0,05.

Também foi avaliada se elevada expressão de p63 mRNA encontrada nas displasias poderia estar relacionada à displasias de alto risco de transformação maligna. Não encontramos diferença significativa entre a expressão de p63 mRNA e o grau de displasia ( $p=0,139$ ), apesar das displasias de alto risco apresentarem expressão de p63 mRNA aumentada, como mostrado na tabela 15.

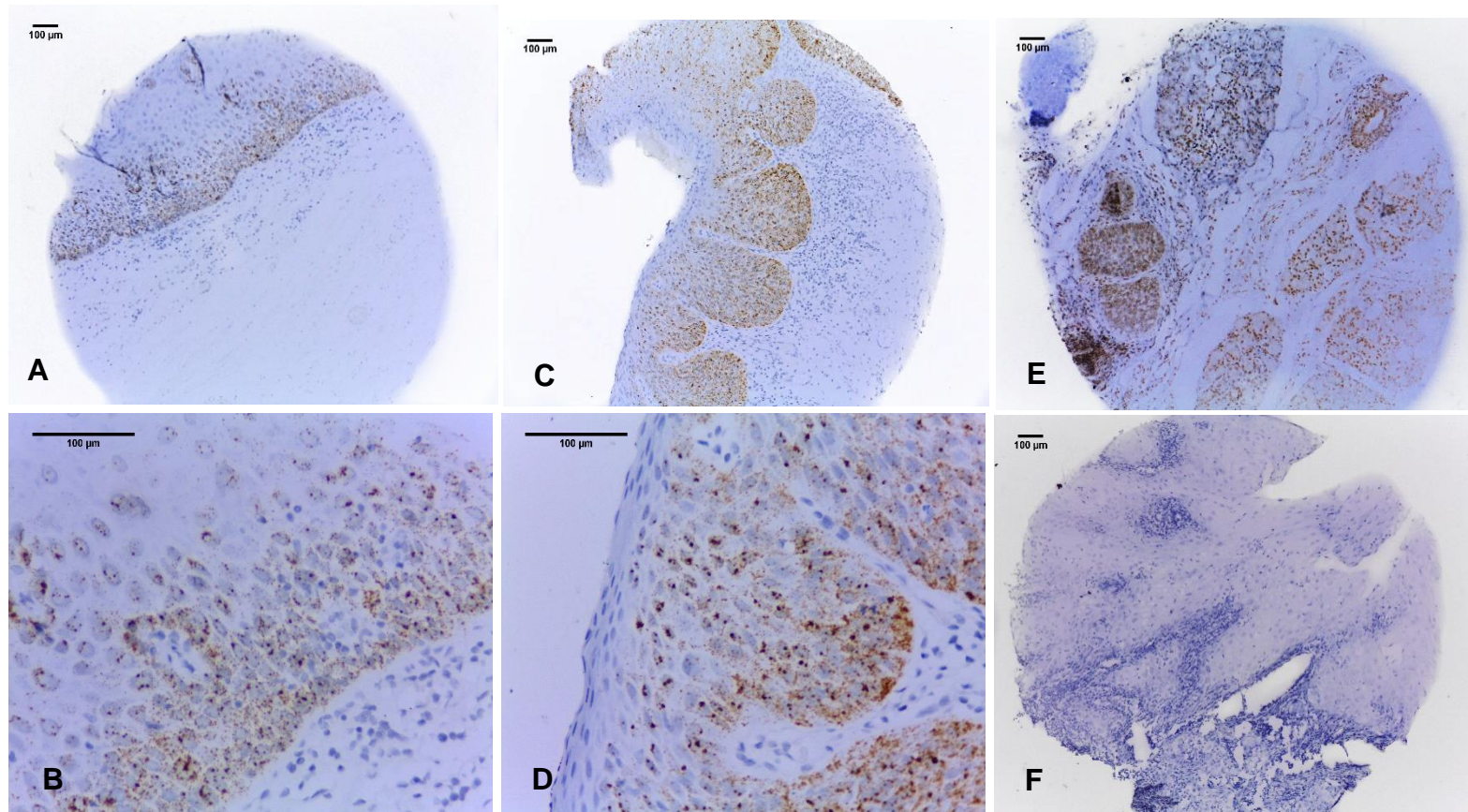
**Tabela 15** - Associação entre expressão de p63 mRNA e o grau de displasia.

Expressão p63 mRNA displasia	Displasia Baixo risco		Displasia Alto risco		<i>p</i>
	n= 28	%	n=16	%	
<b>Alta</b>	15	53,6	12	75,0	0,139
<b>Baixa</b>	13	46,4	4	25,0	

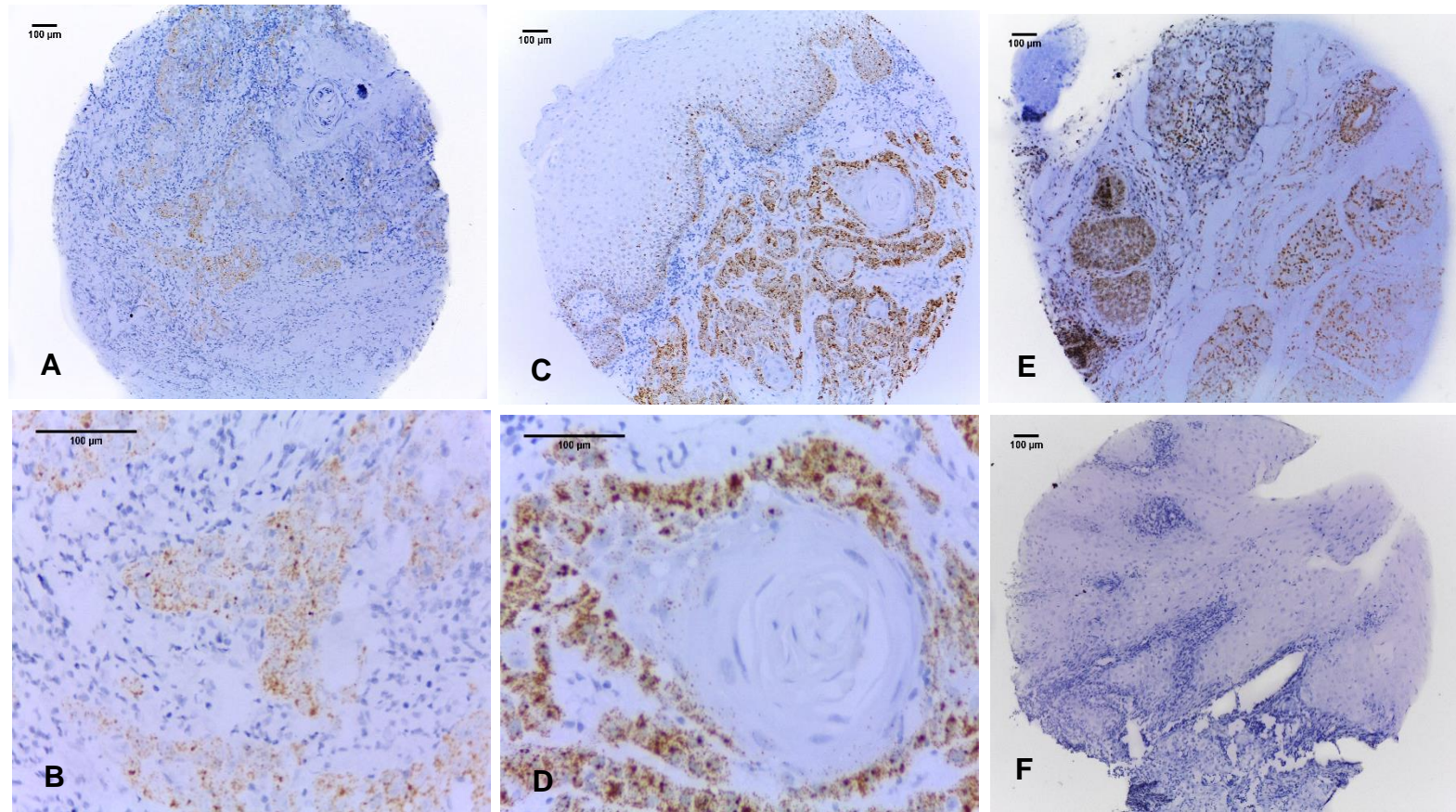
Teste Qui-quadrado para independência. Ausentes: n=65. \* $p \leq 0,05$ .

P63 mRNA pode exibir padrão de expressão nuclear e/ou citoplasmático e sua expressão nas regiões do epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor, assim como os controles positivo e negativo estão exemplificados na Figura 18 e 19.





**Figura 18** - Expressão de p63 mRNA em CEO. (A, B) Marcação de intensidade forte nas camadas basal e para-basal de epitélio adjacente ao tumor; (C, D) Marcação de intensidade forte em displasia de alto risco; (E) Controle positivo UbiquitinaC; (F) Controle negativo Dapβ. Magnificações originais de 100x (A, C, E, F) e 400x (B, D).



**Figura 19** - Expressão de p63 mRNA em CEO. (A, B) Marcação de intensidade fraca em tumor (superfície tumoral); (C, D) Marcação de intensidade forte em tumor (superfície tumoral); (E) Controle positivo UbiquitinaC; (F) Controle negativo Dap $\beta$ . Magnificações originais de 100x (A, C, E, F) e 400x (B, D).

Nossos resultados não mostraram associação significativa entre a expressão de p63 mRNA e as variáveis clínico-patológicas, como pode ser observado na tabela 16.

**Tabela 16** - Associações entre a expressão de p63 mRNA e as variáveis clínico-patológicas (n=109).

Variáveis	Expressão p63 mRNA - Tumor		
	baixa	alta	p
<b>Gênero</b>			
Masculino	34	39	0,185
Feminino	6	14	
<b>Idade (anos)</b>			
≤ 60 anos	22	28	0,835
> 60 anos	18	25	
<b>Tabagismo</b>			
Sim	20	20	0,735
Nunca	6	7	
Ex-tabagista	7	11	
<b>Etilismo</b>			
Sim	18	17	0,543
Nunca	4	5	
Ex-etilista	6	11	
<b>Tamanho do tumor</b>			
T1/T2	18	32	0,116
T3/T4	21	19	
<b>Metástase Linfonodal</b>			
N+	12	20	0,299
N0	26	27	
<b>Estadio</b>			
I/II	15	22	0,655
III/IV	24	29	

\* Teste Qui-Quadrado, \* $p \leq 0,05$

A correlação entre a expressão de p63 mRNA e as variáveis histopatológicas estão representadas na tabela 17. A elevada presença de p63 mRNA nos tumores mostrou associação com a invasão vascular pelas células tumorais ( $p=0,025$ ).



**Tabela 17** - Associações entre a expressão de p63 mRNA e as variáveis histopatológicas (n=109).

Variáveis	Expressão p63 mRNA - Tumor		
	baixa	alta	<i>p</i>
<b>Gradação tumoral</b>			
Bem	15	19	0,697
Moderadamente	23	28	
Pouco	2	5	
<b>TIL</b>			
Baixo	10	12	0,723
Moderado	22	27	
Alto	7	13	
<b>Padrão de invasão</b>			
I	2	2	0,087
II	4	2	
III	10	20	
IV	17	9	
<b>Invasão vascular</b>			
Sim	27	46	0,025*
Não	8	3	
<b>Invasão linfática</b>			
Sim	11	19	0,921
Não	14	23	
<b>Invasão perineural</b>			
Sim	8	19	0,182
Não	8	8	

\* Teste Qui-Quadrado, \* $p \leq 0,05$

## 5.5 EXPRESSÃO DE p63, p40 e p63 mRNA

As expressões de p63, p40 e p63 mRNA nas diferentes regiões analisadas estão indicadas na tabela 18. Alta expressão foi observada em todas as regiões estudadas.

**Tabela 18** – Frequência de expressão de p63, p40 e p63 mRNA em epitélio normal, displasia e tecido tumoral (n=109)

Expressão	Epitélio adjacente ao tumor		Displasia		Tumor	
	Alta (%)	Baixa (%)	Alta (%)	Baixa (%)	Alta (%)	Baixa (%)
p63 <sup>a</sup>	51,1	48,9	54,3	45,7	56,1	43,9
p40 <sup>a</sup>	52,6	47,4	53,7	46,3	53,8	46,2
p63 mRNA <sup>a</sup>	54,8	45,2	63,8	36,2	57,0	43,0

<sup>a</sup>Ausentes: p63 epitélio (n=64); p63 displasia (n=63); p63 tumor (n=11); p40 epitélio (n=71); p40 displasia (n=68); p40 tumor (n=16); p63 mRNA epitélio (n=67); p63 mRNA displasia (n=62); p63 mRNA tumor (n=16).

Para descrever a intensidade da concordância entre as expressões de p63, p40 e de p63 mRNA foi empregada a medida Kappa que é baseada no número de casos cujo resultado de alta/baixa expressão é o mesmo entre as análises. Esta avaliação foi empregada a fim de entender se a expressão encontrada na IHQ clone 4A4 que corresponde a todas as isoformas de p63 dizia respeito em sua maioria a expressão das isoformas oncogênicas  $\Delta N/p40$  (tabela 19).

**Tabela 19** – Análise de concordância Kappa entre as expressões de p63 e p40.

<b>Expressão</b>	<b>n</b>	<b>Kappa</b>	<b>Sensibilidade (%)</b>	<b>Especificidade (%)</b>	<b>p</b>
p63 p40	91	0,270	68,8	58,1	0,010*

\*Concordância Kappa. \*p ≤ 0,05.

Foi encontrada concordância razoável (K=0,270) entre a expressão de p63, que corresponde a expressão de todas as isoformas existentes da proteína (TA e/ou ΔN) e a expressão de p40, que corresponde apenas às isoformas ΔNp63 (p=0,010). Isto indica razoável correspondência nas análises de p63 e p40, sendo que realmente boa parte da expressão encontrada pelas análises de p63 correspondiam as isoformas oncogênicas p40 (ΔN).

Ainda para compreender se elevada expressão de p63 nas regiões estudadas correspondia à elevada expressão da isoforma p40 (ΔN), p63 e p40 foram comparadas entre si. Não foi observada diferença significativa entre suas expressões em nenhum seguimento estudado, o que aponta que as expressões são parecidas, ou em muitos casos as mesmas, conforme mostrado na tabela 20.

**Tabela 20** – Comparação entre a expressão de p63 e p40 nas diferentes regiões estudadas.

<b>Expressão nas regiões</b>	<b>n</b>	<b>Alta expressão</b>	<b>Baixa expressão</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>p</b>
Epitélio p63	45	23	22	1,51	0,504	1,000
Epitélio p40	38	20	18	1,53	0,506	
Displasia p63	46	25	21	1,54	0,504	0,683
Displasia p40	41	22	19	1,54	0,505	
Tumor p63	98	55	43	1,56	0,499	0,602
Tumor p40	93	50	43	1,54	0,501	

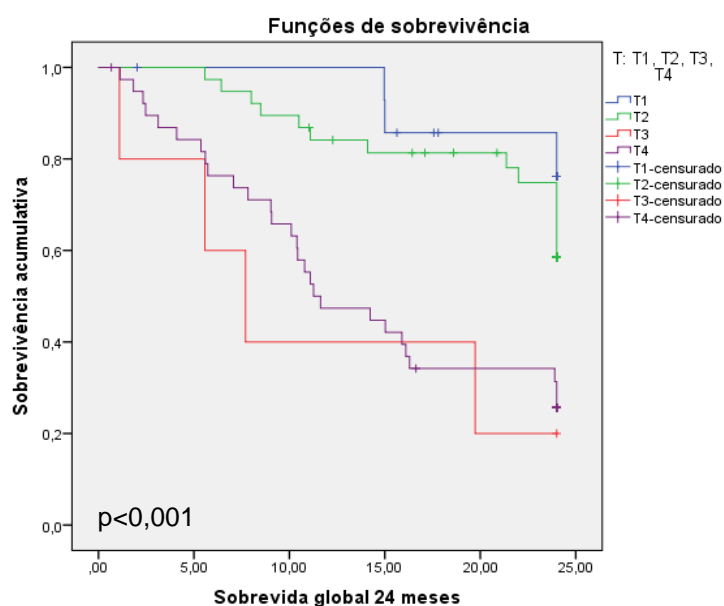
\*Wilcoxon test. \*p ≤ 0,05.

## 5.6 ANÁLISES DE SOBREVIVÊNCIA

### 5.6.1 Sobrevida global

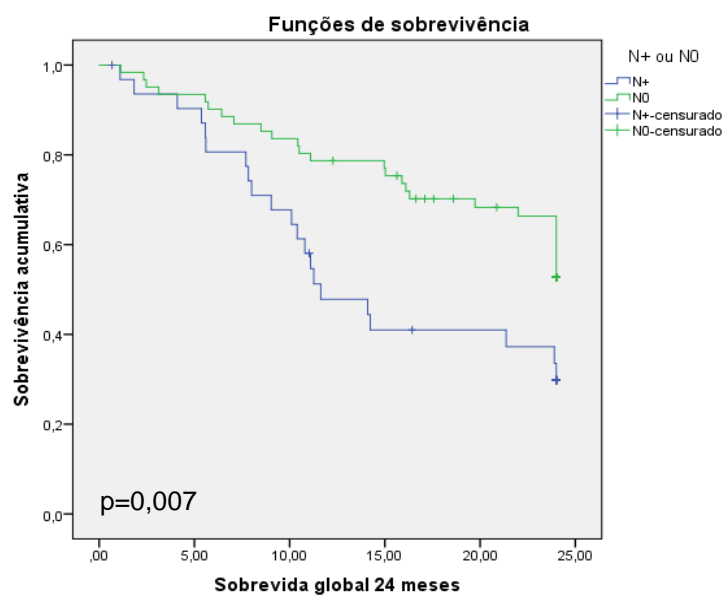
Os indivíduos foram acompanhados por um tempo médio de 24 meses, sendo que neste período, 51 (49,5%) casos progrediram para o óbito.

Considerando a ocorrência do óbito como desfecho final, o tamanho do tumor primário apresentou relação significativa com a sobrevida global, no qual indivíduos com tamanhos de tumores T1 e T2 tiveram maior sobrevida global em relação aos tumores maiores T3 e T4 ( $p<0,001$ ) (Figura 20).



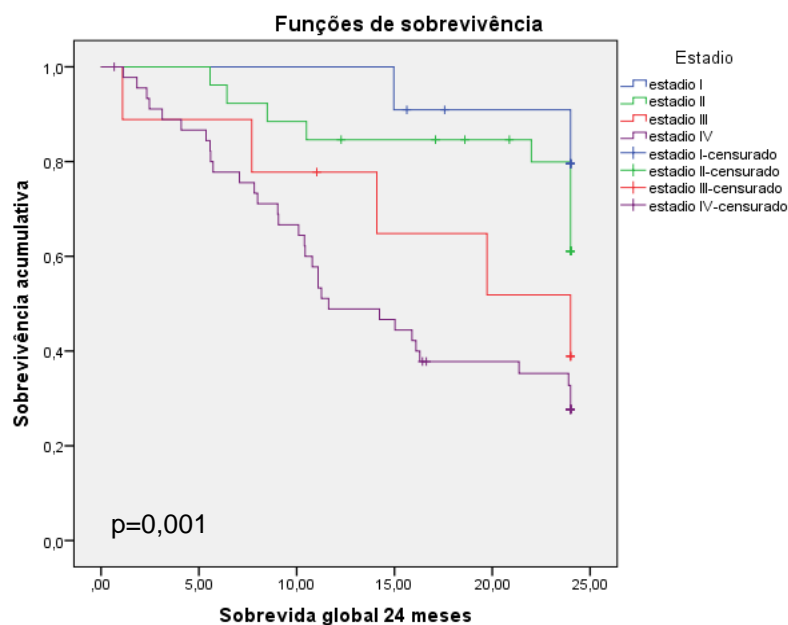
**Figura 20** - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação ao tamanho do tumor primário ( $p<0,001$ ).

A presença de metástase em linfonodos regionais (N+) foi associada com piores índices de sobrevida global, no qual em um período médio de 12 meses cerca de 50% dos indivíduos que apresentaram metástase em linfonodos regionais evoluíram ao óbito ( $p=0,007$ ) (Figura 21).



**Figura 21** - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação à metástase em linfonodos regionais ( $p=0,007$ ).

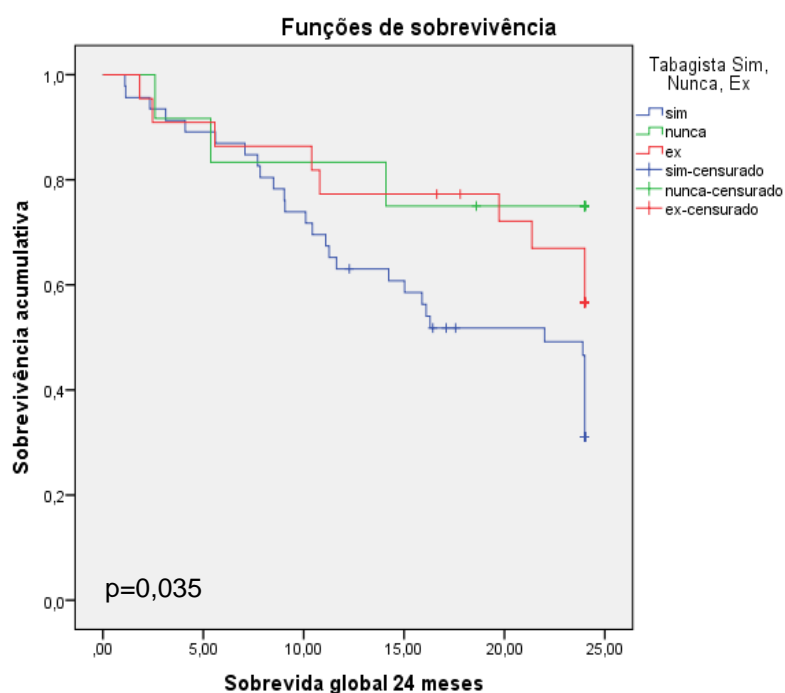
Estadios clínicos avançados, como estadios III e IV também foram relacionados com pior sobrevivência global em 24 meses ( $p=0,001$ ) (Figura 22).



**Figura 22** - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação ao estadio clínico ( $p=0,001$ ).

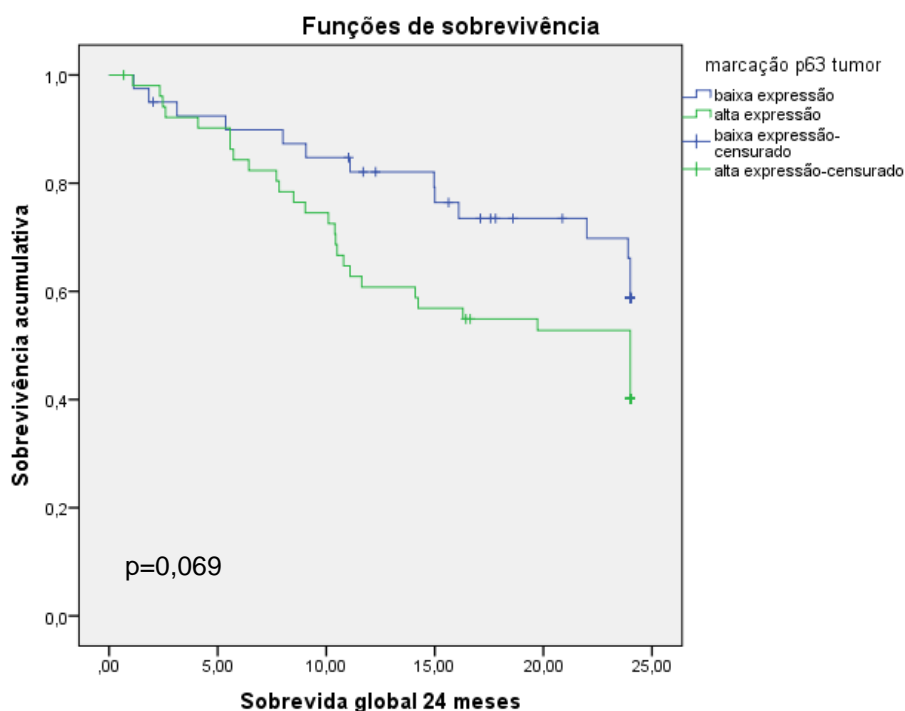


Indivíduos tabagistas apresentaram piores taxas de sobrevivência que os indivíduos que ex-tabagistas ou que nunca fumaram, conforme representado na figura 23 ( $p=0,035$ ).



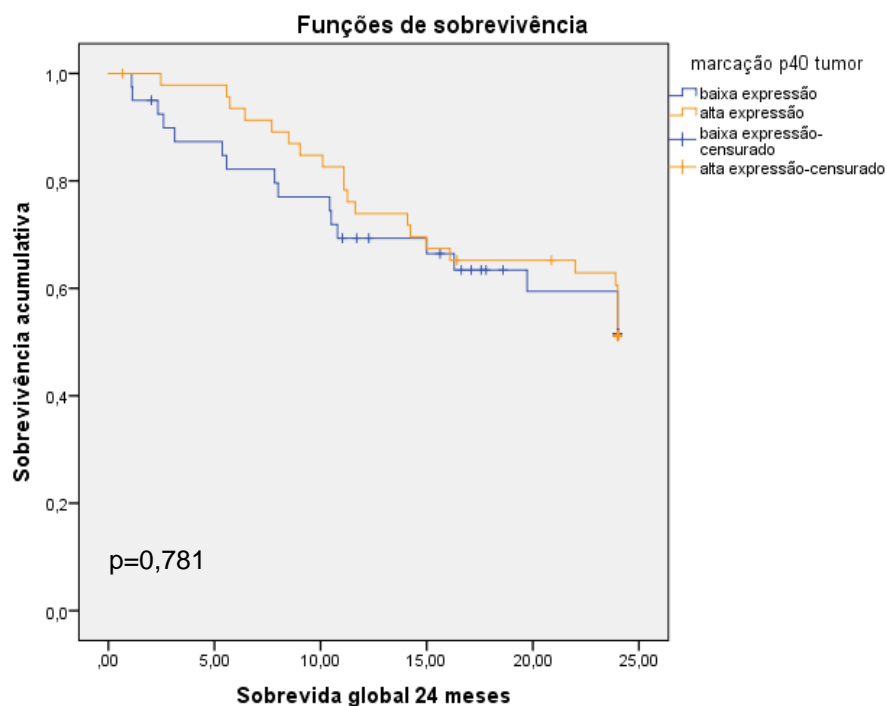
**Figura 23** - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação ao tabagismo ( $p=0,035$ ).

A expressão de p63, apesar de elevada nos tumores, não se mostrou estatisticamente significativa com os índices de sobrevida, porém em um tempo médio de 12 meses cerca de 40% dos indivíduos com alta expressão de p63 progrediram ao óbito, conforme ilustrado na figura 24 ( $p=0,069$ ). A média de sobrevivência dos indivíduos com alta expressão de p63 foi 16,78 meses enquanto dos indivíduos com baixa expressão de p63 foi 19,90 meses.



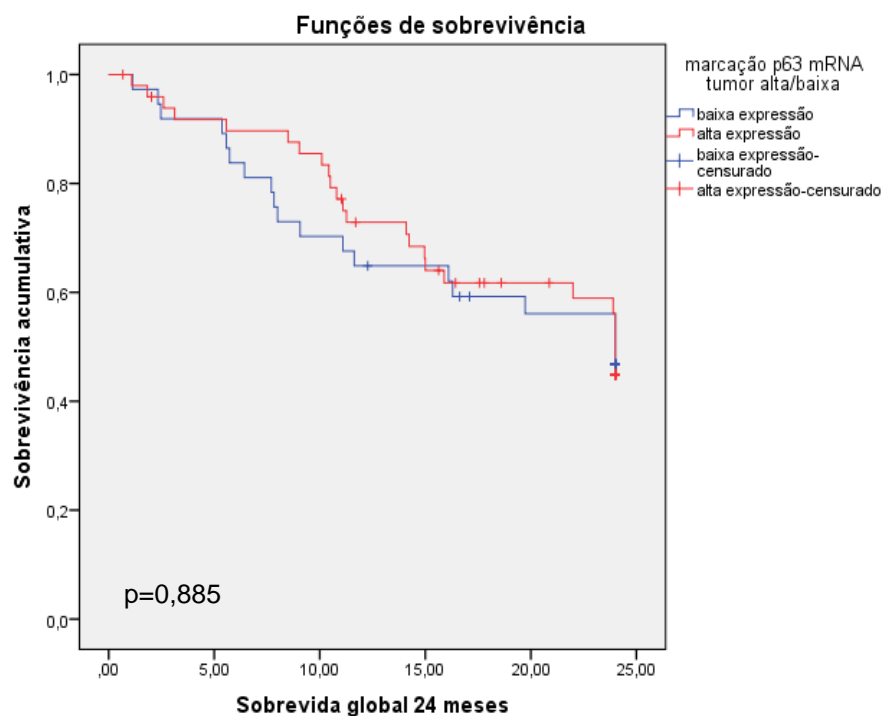
**Figura 24** - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação à expressão de p63 ( $p=0,069$ ).

A expressão de p40 também não se mostrou significativa estatisticamente com os índices de sobrevida, conforme ilustrado na figura 25 ( $p=0,781$ ).



**Figura 25** - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação à expressão de p40 ( $p=0,781$ ).

Ademais, a expressão de p63 mRNA também não se mostrou relacionada aos índices de sobrevivência global, conforme mostrado na figura 26 ( $p=0,885$ ).

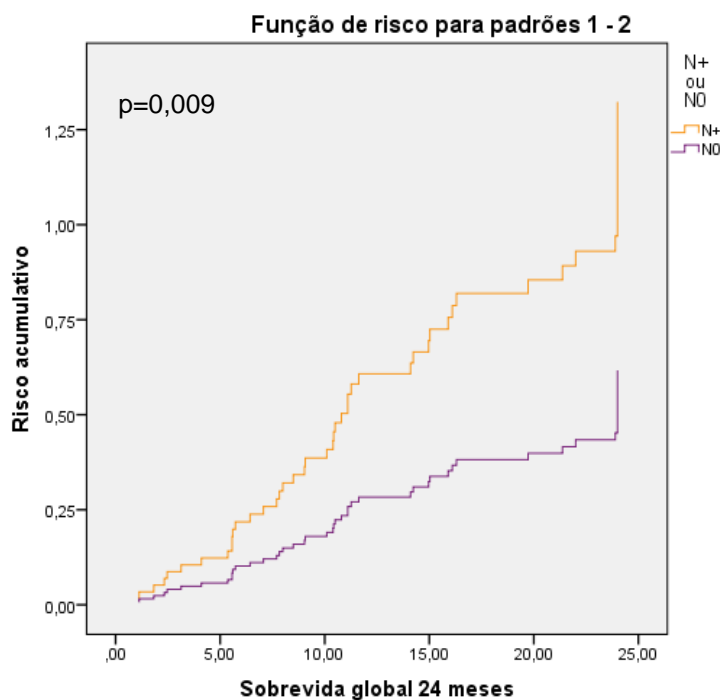


**Figura 26** - Curva de sobrevida global pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida global em relação à expressão de p63 mRNA ( $p=0,885$ ).

A análise de regressão de Cox (modelo de riscos proporcionais) confirmou que a presença de metástase em linfonodos regionais foi considerada um fator de risco ao óbito ( $HR=2,144$ ;  $IC=1,207-3,809$ ), no qual os indivíduos com metástase regional têm 2,144 vezes mais chances de evoluírem a óbito quando comparados aos sem metástase regional ( $p=0,009$ ) (Tabela 21 e Figura 27).

**Tabela 21** - Análise regressiva multivariada da sobrevida livre de doença.

Variável	Categorias	HR (IC 95%)	p
Metástase em linfonodos regionais	N0/N+	2,144 (1,207-3,809)	0,009*

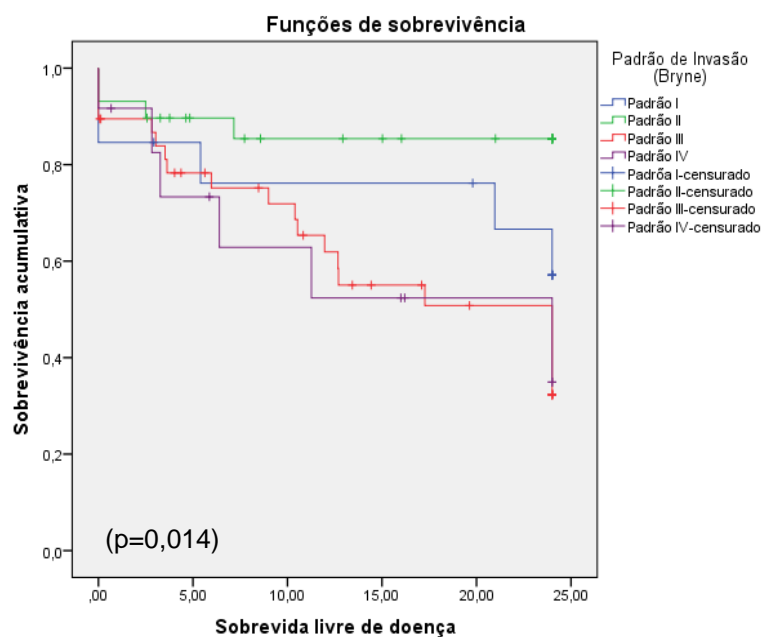


**Figura 27** – Modelo de riscos proporcionais. Risco à evolução ao óbito em relação à metástase em linfonodos regionais ( $p=0,009$ ).

### 5.6.3 Sobrevida livre de doença

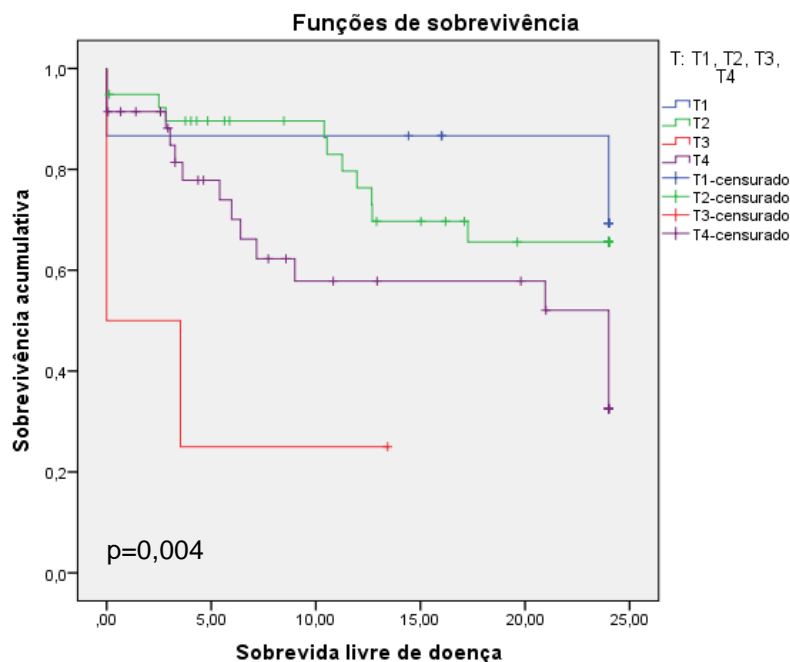
Em um tempo médio de 24 meses, 35 indivíduos (36,1%) evoluíram com recorrência da doença. Considerando a recidiva local, regional ou à distância da doença como desfecho final o cálculo da sobrevida livre de doença foi realizado.

Os padrões de invasão apresentando maior dissociação entre grupos de células ou células individuais (padrões III e IV) mostraram pior sobrevida livre de doença do que padrões de invasão mais compressivos (padrões I e II), que apresentaram menos recidiva da doença, conforme ilustrado graficamente na figura 28 ( $p=0,014$ ).



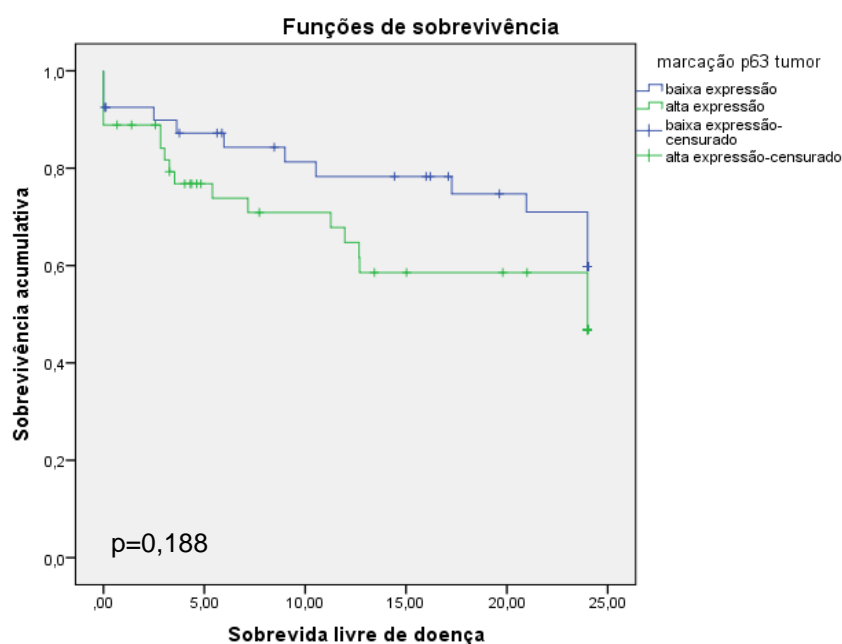
**Figura 28** - Curva de sobrevida livre de doença pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida livre de doença em relação ao padrão de invasão (p=0,014).

Indivíduos com tamanho do tumor maiores (T3 e T4) também apresentaram piores taxas de sobrevida livre de doença do que aqueles com tumores T1, que tiveram menos recidiva da doença (p=0,004) (Figura 29).

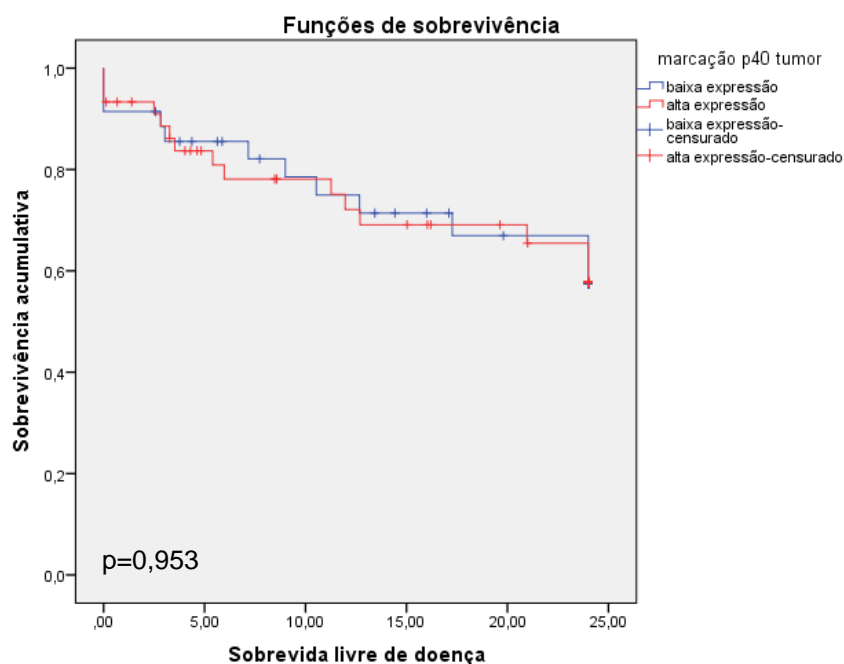


**Figura 29** - Curva de sobrevida livre de doença pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida livre de doença em relação ao tamanho do tumor primário (p=0,004).

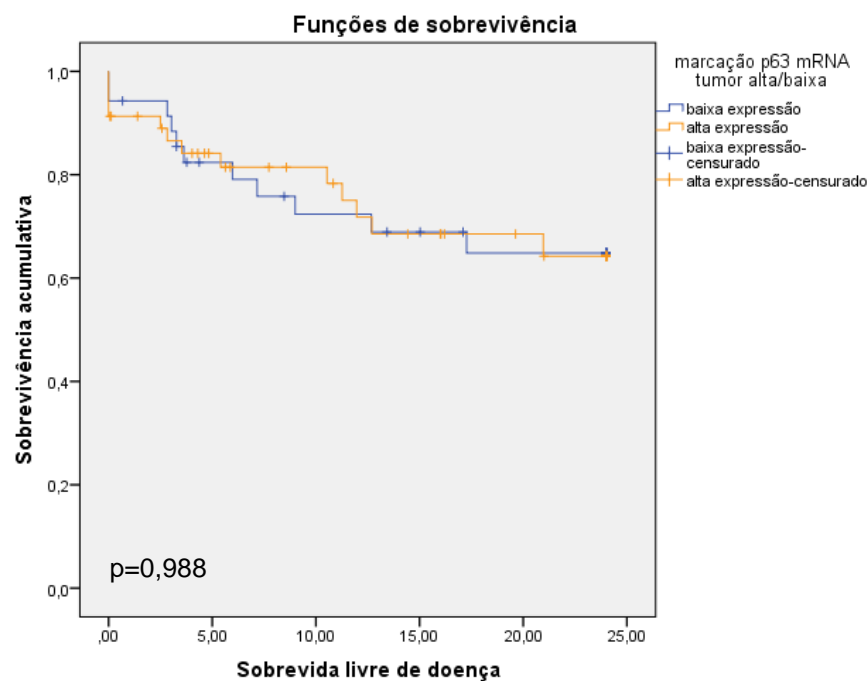
As expressões de p63, de p40 e de p63 mRNA no tecido tumoral não se mostraram estatisticamente relacionadas com os índices de sobrevida livre de doença, conforme mostrado nas figuras 30, 31 e 32 respectivamente ( $p=0,188$ ;  $p=0,953$ ;  $p=0,988$ ).



**Figura 30** - Curva de sobrevida livre de doença pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida livre de doença em relação à expressão de p63 ( $p=0,188$ ).



**Figura 31** - Curva de sobrevida livre de doença pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida livre de doença em relação à expressão de p40 ( $p=0,953$ ).



**Figura 32** - Curva de sobrevida livre de doença pelo método Kaplan-Meier e log-rank. Sobrevida livre de doença em relação à expressão de p63 mRNA ( $p=0,988$ ).

Quando avaliados os potenciais indicadores de prognóstico: gradação tumoral, padrão de infiltração linfocitário tumoral, invasão de vasos sanguíneos, invasão linfática e perineural, sítio anatômico tumoral e etilismo não foi possível estabelecer correlação com as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença.

## 6. DISCUSSÃO

O câncer oral é uma doença que geralmente atinge indivíduos com idade avançada, ocorrendo numa faixa de idade dos 50 aos 70 anos. Encontramos uma média de idade de 60,49 anos e a média de idade encontrada na maioria dos países está entre 51-55 anos, mas média superior, em torno de 64 anos, foi por exemplo observada na Tailândia. Recentemente, tem havido uma mudança para uma idade mais jovem ao diagnóstico, no qual já é possível encontrar literatura com cerca de 17% dos pacientes possuindo idade igual ou inferior a 40 anos (BHURGRI et al., 2006; RAO et al., 2013).

As diferenças de gênero encontradas em nossas análises, como predomínio do sexo masculino em 78,0% podem ser atribuídas principalmente às variações nos hábitos de consumo de tabaco e álcool, como fomos capazes de observar, 88% dos indivíduos fumantes e 86,4% dos etilistas eram homens. Nos últimos anos, entretanto, o percentual de mulheres afetadas pelo câncer bucal tem aumentado devido a mudanças em seu estilo de vida. Estudo realizado para estimar a real diferença de gênero e o risco para desenvolvimento de câncer encontraram que as mulheres tabagistas, ao contrário do que se imaginava, tinham maior risco de desenvolvimento de câncer bucal em comparação aos fumantes do sexo masculino. (ANTUNES et al., 2013; GUPTA et al., 2017; MUSCAT et al., 1996).

Neste trabalho, indivíduos que possuíam hábito tabagista apresentaram presença reduzida de infiltrado linfocitário tumoral quando comparados aos indivíduos não tabagistas. Tal evento tem relação com a exposição contínua aos carcinógenos presentes no tabaco, capazes de provocar agressões que contribuem para a imunossupressão, afetando tanto a resposta imune celular e quanto a humoral. O tabagismo é associado com efeitos pró-inflamatórios e efeitos anti-inflamatórios. Os efeitos inibitórios do tabagismo foram atribuídos à nicotina, hidroquinona e ao monóxido de carbono da fumaça, que promovem diminuição da atividade de células T, neutrófilos e redução da apresentação de antígenos. Os efeitos pró-inflamatórios de outro modo estão mais relacionados à alergias e autoimunidade. (ARNSON; SHOENFELD; AMITAL, 2010)



As células do sistema imune infiltradas em tumores tem sido consideradas como indicadores de prognóstico em várias malignidades humanas. Na resposta imune adaptativa, os linfócitos citotóxicos CD8+ são componentes cruciais da imunidade mediada por células visto que produzem interferon- $\gamma$  após a interação com alvos tumorais. Linfócitos CD8+ tanto localizados intra como peri-tumoral foram considerados como os principais mecanismos de defesa contra o câncer e sua expressão mostrou prever melhor sobrevivência em indivíduos com câncer colorretal, esofágico e de cabeça e pescoço. Estudo em câncer colorretal mostrou inclusive que a presença de infiltração T CD8+ apresentava um valor prognóstico superior e independente da classificação TNM. (FANG et al., 2017; GALON et al., 2006)

Observamos também em nosso estudo que tumores menores (T1 e T2) e indivíduos em estadios iniciais (I e II) apresentaram maior presença de infiltrado linfocítico tumoral. Achados semelhantes também foram encontrados em câncer colorretal por Mlecnik e colaboradores em 2011, no qual observou-se uma correlação inversa entre a densidade celular imune e o estadio tumoral. Em seu estudo, assim como no nosso, das amostras com a maior densidade de células imunes, a maioria era de tumores *in situ* ou tumores T1. Seus dados sugerem ainda que mesmo tumores com mínima invasão, mas que apresentem pouco infiltrado linfocítico tumoral serão mais prováveis de sofrer recidiva da doença e para esses pacientes, a cirurgia pode não ser curativa (BROUSSARD; MARY L. DISIS, 2011; MLECNİK et al., 2011).

A presença do hábito de fumar em nossas avaliações também mostrou-se associada com padrões de invasão tumoral dos tipos III e IV, no qual as células, ou grupo de células estão mais dissociadas entre si, conforme seu grau de coesão. O padrão de invasão tumoral refere-se à maneira pela qual o câncer infiltra o tecido subjacente, sendo intuitivo que neoplasias se caracterizem pela infiltração de forma amplamente dispersa sejam mais agressivas do que as que crescem volumosamente (BRANDWEIN-GENSLER et al., 2005).

O hábito de fumar é responsável pelo aumento de células aneuploides no epitélio oral, que são mais presumíveis de sofrer transformação maligna. Além de participar da gênese do CEO, o tabagismo e etilismo podem afetar ainda as características clinicopatológicas do tumor, como taxas de recorrência, resposta ao tratamento,

sobrevivência, prognóstico e ainda, como observado no nosso estudo, o padrão de invasão, que são piores em pacientes expostos a esses fatores (HINTZ et al., 2013).

Ademais, o hábito de consumir álcool relacionou-se com a invasão de células tumorais em vasos sanguíneos. Estudos epidemiológicos e experimentais indicam que a exposição ao etanol aumenta a progressão tumoral e está relacionada à invasão e metástase. A metástase consiste em múltiplos processos envolvendo extravasamento de células tumorais através das paredes dos vasos sanguíneos e a perda de integridade da barreira endotelial que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos e desempenha um papel fundamental no extravasamento de células tumorais (DO et al., 2003; XU et al., 2012).

O endotélio que reveste a superfície interna dos vasos sanguíneos constitui um barreira seletiva entre a corrente sanguínea e os tecidos subjacentes. Mudanças na integridade do endotélio estão envolvidas em muitos processos tanto fisiológicos como patológicos, incluindo migração leucocitária e extravasamento de celular, que pode incluir o de células tumorais. O etanol tem a capacidade de alterar a barreira endotelial induzindo o rearranjo do citoesqueleto de actina e interrompendo junções de aderência, o que resulta em aumento da permeabilidade do endotélio e essas alterações podem facilitar a invasão e consequentemente metástases (XU et al., 2012).

Em nossas avaliações, a expressão de p63 foi predominantemente elevada em todos os tecidos analisados. A sobre-expressão de p63 reflete a imaturidade da linhagem de células tumorais, que por sua vez pode causar a ruptura da diferenciação terminal e consequentemente preservar sua capacidade de se multiplicar. Lauxen et al (2014) encontrou achados semelhantes, no qual todos os espécimes de seu estudo apresentaram níveis elevados de expressão de p63 sugerindo o envolvimento dessa proteína no desenvolvimento e manutenção do câncer oral, sendo que p63 era encontrada em todas as camadas epiteliais, com diminuições graduais da camada basal em direção à camada escamosa, padrão que também fomos capazes de observar.

Lo Muzio et al (2007) tiveram resultados bem similares ao de nossa pesquisa. Eles encontraram de expressão de p63 aumentada em 57,8% de CEO, enquanto encontramos super-expressão em 56,1% por análises de IHQ e 57,0% em análises de hibridação *in situ* de RNA. Em seu estudo, Lo Muzio (2007) encontrou ainda que a porcentagem de células que expressam p63 foi significativamente menor em tumores bem diferenciados em relação a indiferenciados, indicando efeito de p63 no potencial de indiferenciação celular.

A expressão de p63 foi comparada entre as regiões investigadas e por meio de nossas análises de IHQ observamos expressão de p63 mais elevada nos tumores do que nas displasias e aumentadas nos tumores quando comparado ao epitélio adjacente. Tal distinção não foi encontrada via análises de p63 mRNA. SINHA et al (2015), de mesmo modo, encontraram via IHQ número de células positivas para p63 em neoplasias orais excepcionalmente aumentada quando comparado ao epitélio bucal normal. Esses dados apontam que a expressão protéica elevada desta proteína desempenha função importante na carcinogênese oral

Por outro lado, Bortoluzzi et al (2004) encontraram alta expressão de p63 de forma consistente em epitélio oral normal, lesões pré-malignas e carcinomas. Este padrão também observamos nas nossas análises quando consideramos p63 mRNA, onde a expressão do RNA não foi substancialmente diferente entre as regiões estudadas. Nós, assim como o grupo de Bortoluzzi, não fomos capazes de diferenciar as categorias de lesões umas das outras ou da mucosa “normal” pelo padrão de expressão de p63 mRNA isoladamente, o que indica que provavelmente o gene está sendo igualmente transcrito em todas regiões, mas as taxas de tradução são diferentes.

Indivíduos com idade avançada, tais quais aqueles que utilizavam tabaco e que possuíam tamanho de tumores maiores (T3 e T4) manifestaram elevada expressão da proteína p63, assim como elevada expressão de p63 mRNA nos tumores mostrou associação com a invasão de vasos sanguíneos pelas células tumorais.

Esses eventos indicam relação entre a presença de grupos de risco e fatores de risco relacionado ao câncer, assim como fenótipo tumoral mais agressivo, com a expressão

ampliada de p63. Em seu trabalho, Lo Muzio et al (2005) analisou a correlação entre expressão de p63 e variáveis clínico-patológicas como a idade e o tamanho do tumor e não obteve resultados expressivos, diferentemente do que fomos capazes de observar neste estudo.

Como diferentes isoformas de p63 têm atividades e propriedades biológicas diferentes, tornou-se importante identificar proteínas p63 individuais para entender suas respectivas funções em tecidos normais e neoplásicos.

TAp63 mantém células-tronco na derme em quiescência, enquanto  $\Delta$ Np63 não é expresso e não possui funcionalidade nessas células. Ao mesmo tempo,  $\Delta$ Np63 induz a diferenciação terminal de células amplificadoras transitórias na epiderme, enquanto que TAp63 é dispensável para esta função. Isso exemplifica como as isoformas p63 tem diferentes funções no mesmo tecido e há uma necessidade de entender como estas atividades influenciam os fenótipos tumorais observados (GILMORE, 2008; KOSTER et al., 2007; SU et al., 2012)

No entanto, a maioria dos estudos emprega apenas o anticorpo monoclonal 4A4 direcionado para o core central da proteína que não faz distinção entre as diferentes isoformas de p63. Tal utilização se deu principalmente pela até então inexistência de anticorpos comercialmente disponíveis para as isoformas p63 específicas (NYLANDER et al., 2002).

As modificações pós-traducionais de p63 tem papel importantes nas propriedades e na estabilização das proteínas, contudo tais modificações sofridas por p63 e suas várias isoformas ainda é uma área que não foi amplamente investigada. Estudos usando IHQ ou reação em cadeia da polimerase (PCR) que distinguem entre as isoformas TA e o  $\Delta$ N p63 em tecidos tumorais humanos indicaram que as isoformas de TA de p63 não são expressas ou são expressas em níveis muito baixos. Por outro lado, as isoformas  $\Delta$ Np63 são expressas em níveis elevados. Esses padrões de expressão são consistentes com TAp63 funcionando como um gene supressor de tumor e  $\Delta$ Np63 funcionando como oncogene. Existem vários exemplos de tumores em que a perda de expressão de TAp63 foi encontrado em lesões invasivas e metastáticas, incluindo carcinoma da bexiga, mamário, adenocarcinoma pulmonar, e

carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, o que é consistente com a sua função de supressor de metástase. Baixa expressão de TAp63 coincide frequentemente com alta expressão de  $\Delta$ Np63 em lesões que progrediram (COMPÉRAT et al., 2007; NYLANDER et al., 2002; ROCCO et al., 2006)

P40, no entanto, é um anticorpo que reconhece exclusivamente  $\Delta$ Np63, e seu uso como marcador foi mais recentemente introduzido no carcinoma epidermóide do pulmão. Neste contexto, p40 se mostrou mais específico do que p63. Foschini et al (2004) sugeriram que a ausência de significância de relação entre a imunomarcacão de p63 e o prognóstico em pacientes com CEO foi porque o anticorpo A4A comumente usado contra p63 não discrimina entre as diferentes isoformas.

Contradizendo o referido por Foschini et al (2004), outros autores atribuíram a marcação encontrada em seu estudo de p63 às isoformas  $\Delta$ Np63. Assim, a falta de correlação entre a presença de p63 e o prognóstico em pacientes com CEO em estudos imuno-histoquímicos deve-se mais ao pequeno número de casos examinados do que ao anticorpo utilizado. Em nosso estudo, com número de casos mais elevado, observamos concordância razoável entre a expressão de p63, que corresponde a expressão de todas as isoformas existentes da proteína (TA e/ou  $\Delta$ N) e a expressão de p40, que corresponde apenas as isoformas  $\Delta$ Np63. Isto significa que grande parte da expressão encontrada pelas análises de p63 correspondiam as isoformas oncogênicas ( $\Delta$ N), assim como observado por Nylander et al (2002).

Em suas investigações, Chen; Hsue; Lin (2005) acompanhou por 5 anos indivíduos com lesões pré-malignas e concluiu que 16,7% das displasias epiteliais moderadas e 30% de displasias severas apresentando p63 positivo sofreram uma transformação maligna para carcinomas de células escamosas. Em nossas análises, contudo, a expressão de p63 não foi relacionada à displasias de alto risco, porém a expressão de p40 foi maior nas displasias. Notamos que essa elevada expressão de p40 estava associada com ocorrência de displasias de alto risco de malignização, evidenciando potencial atuação de p40 nas lesões com potencial de malignização e participação durante a progressão dessas lesões pré-malignas para de fato lesões malignas

Elevada expressão de p40 em CEO foi associada com tumores pouco diferenciados e com a ocorrência de invasão linfática. Estes achados também estão relacionados com os encontrados por Foschini et al (2004), em sua série de casos de CEO, no qual,  $\Delta$ Np63 foi a variante mais expressa nos tumores, sendo presente em todos os casos, exceto um e foi a única isoforma expressa em casos que se comportaram de forma extremamente agressiva, gerando rapidamente metástases distantes.

A expressão nuclear de p40 no fronte de invasão, que são células das margens invasivas mais profundas do tumor, pôde ser associada com tabagismo, demonstrando que indivíduos que possuíam tal fator de risco apresentaram maior expressão de  $\Delta$ Np63 em uma região altamente agressiva e geralmente menos diferenciada em comparação com as células na porção mais superficial do tumor (VEDAM; BOAZ; SRINATARAJAN, 2014).

Na verdade, estudos usando o anticorpo A4A, mostraram uma correlação entre a expressão de p63 e o prognóstico no carcinoma urotelial invasivo da bexiga, no qual expressão de  $\Delta$ Np63 diminuída está associada a taxas de sobrevivência reduzidas em neoplasias uroteliais, diferentemente do encontrado em carcinomas de células escamosas, onde a sobre-expressão de  $\Delta$ Np63 associa-se com crescimento tumoral (BARBIERI; BARTON; PIETENPOL, 2003; KOGA et al., 2003; LO MUZIO et al., 2005; PARSA et al., 1999)

No que concerne o tratamento e as taxas de sobrevivência, observamos que como o esperado, estadios iniciais são preferencialmente direcionados à cirurgia, enquanto estadios mais avançados à radioterapia com ou sem quimioterapia. Podemos assumir ainda associação entre a modalidade de tratamento e o óbito, sendo que a radioterapia exclusiva ou associada à quimioterapia foram as modalidades mais associadas ao óbito, o que claramente está correlacionado ao fato desses mesmos indivíduos possuírem estadios mais avançados da doença.

A cirurgia é o modo mais estabelecido de tratamento definitivo para a maioria dos cânceres orais iniciais e os fatores que afetam a escolha do tratamento são relacionados majoritariamente as características tumorais e ao paciente, como o sítio primário, localização, tamanho e profundidade da infiltração. Cirurgia mais

quimioterapia e/ou radioterapia são utilizados para o tratamento de doenças avançadas. Com a introdução da Cisplatina, ao contrário da resposta encontrada em outras regiões, a resposta à quimioterapia não se traduziu em controle de longo prazo do carcinoma de células escamosas oral primário e embora a quimioterapia com intenção paliativa possa alcançar taxas de resposta que variem de 10% a 35%, não há evidências de prolongamento da sobrevivência (CHEN; LIN; CHEN, 2015; SHAH ET AL, 2009; WOLFF; FOLLMANN; NAST, 2012)

Durante o período de acompanhamento, 49,5% dos indivíduos evoluíram ao óbito. Em nossas análises, as variáveis: tamanho do tumor primário T3/T4, metástase em linfonodos regionais e estadio avançado foram consideradas fatores relacionados ao pior prognóstico em CEO. Na maioria dos países, inclusive no Brasil, a taxa de sobrevida em 5 anos para CEO é semelhante com a que encontramos, de aproximadamente 50%. O estadio da doença no momento do diagnóstico, que leva em consideração o tamanho do tumor primário e o acometimento linfonodal, certamente afeta as taxas de sobrevida; onde na cavidade oral a taxa de sobrevivência no estadio I é cerca de 70%, enquanto para o estágio IV, cai para cerca de 30%. Observamos ainda que indivíduos tabagistas, ao contrário dos não tabagistas, ou ex-tabagistas apresentaram piores índices de sobrevivência. Fang et al (2014) também encontrou que fumar estava associado a piores desfechos, no qual o tabagismo aumentou em aproximadamente duas vezes no risco de recorrência e 5 vezes no risco de morte (SCHNEIDER et al., 2014).

A expressão de p63, apesar de elevada nos tumores, não se mostrou estatisticamente relacionada com os índices de sobrevida global e livre de doença, contudo em um tempo médio de 12 meses cerca de 40% dos indivíduos com alta expressão de p63 evoluíram ao óbito e aqueles com p63 elevado apresentaram cerca de 3 meses a menos de sobrevida média. Lo Muzio et al (2005), encontrou que os casos com expressão elevada de p63 foram mais agressivos e relacionados a menor prognóstico. Tais dados respaldam a possibilidade de que a expressão de p63 possa ser útil para identificar casos de carcinoma de células escamosas orais mais agressivos e invasivos.

Como marcador preditivo, a elevada de p63 foi associada a uma fraca resposta à radiação e a uma menor sobrevivência em CEO nos estudos de Moergel et al (2010). Em contraste, no câncer de pulmão, a amplificação e a superexpressão de p63 está relacionada com a sobrevivência prolongada de pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células. De fato, Koga et al (2003), ao analisar a expressão de p63 em uma série de CEOs por meio de PCR também identificou que a isoforma TAp63 apareceu em casos com melhor sobrevivência ao passo que marcação de  $\Delta$ Np63 mais alta assim foi correlacionada com a pior sobrevivência (FLORES; TSAI; CROWLEY, 2002; KOGA et al., 2003; MOERGEL et al., 2010; NEKULOVA et al., 2013)

Em um tempo médio de 24 meses, 36,1% dos indivíduos evoluíram com recorrência local, regional ou à distância. Indivíduos com tumores maiores e com padrões de invasão apresentando maior dissociação celular (padrões III e IV) tiveram maiores taxas de recidiva. Em seu estudo de Almangush et al (2015) encontrou a profundidade de invasão e pior padrão de invasão como os mais fortes preditores patológicos para a recorrência locorregional, com risco 1,46 vezes maior de recidiva da doença nos indivíduos com padrão de invasão mais disperso.

Sendo assim, como proposto, é de fundamental importância entender os mecanismos envolvidos na progressão tumoral e qual o papel dos genes envolvidos nesse processo, assim como a atividade dessas moléculas no fenótipo tumoral por meio das avaliações de prognóstico.



## 7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados destacam que p63 pode ser considerado um biomarcador de progressão tumoral em CEO, estando envolvido na tumorigênese, principalmente nas displasias através da elevada expressão das isoformas  $\Delta N$  (p40).

Apesar da elevada expressão de p63 indicar piores taxas de sobrevivência, a expressão de p63 não se mostrou efetivamente como indicador de prognóstico, merecendo ampliação nas investigações.

Tumores menores, ausência de metástase em linfonodos regionais e consequentemente estadios iniciais mostraram-se importantes para melhorar as taxas de sobrevivência global e sobrevivência livre de doença.

Hábitos, como o consumo de tabaco e álcool, mostraram-se presentes em casos de comportamento tumoral mais agressivo, redução de infiltrado linfocitário tumoral, piores padrões de invasão tumoral, invasão vascular e pior taxa de sobrevida global.

A utilização da expressão de genes potencialmente envolvidos na carcinogênese como p63, pôde contribuir para identificação de marcador de transformação que possa ser clinicamente relevante, assim como o conhecimento das taxas de sobrevivência em câncer e os fatores a ela relacionados podem colaborar para monitorar o resultado terapêutico, bem como identificar fatores prognósticos, a fim de aumentar a sobrevida.

## 8. REFERÊNCIAS

ALMANGUSH, A. et al. For early-stage oral tongue cancer, depth of invasion and worst pattern of invasion are the strongest pathological predictors for locoregional recurrence and mortality. **Virchows Archiv**, v. 467, n. 1, p. 39–46, 2015.

ANTUNES, J. L. F. et al. Gender and racial inequalities in trends of oral cancer mortality in Sao Paulo, Brazil. **Revista de Saude Publica**, v. 47, n. 3, p. 470–478, 2013.

ARNSON, Y.; SHOENFELD, Y.; AMITAL, H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, n. 3, p. J258–J265, 2010.

BALLMAN, K. V. Biomarker: Predictive or prognostic? **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 33, p. 3968–3971, 2015.

BARBIERI, C. E.; BARTON, C. E.; PIETENPOL, J. A.  $\Delta$ Np63 $\alpha$  Expression Is Regulated by the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 51, p. 51408–51414, 2003.

BARNES, L. et al. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. **WHO Classification of Tumour**, n. 9, p. 163–175, 2005.

BEYER, U. et al. Endogenous retrovirus drives hitherto unknown proapoptotic p63 isoforms in the male germ line of humans and great apes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 9, p. 3624–3629, 2011.

BHURGRI, Y. et al. Epidemiological review of head and neck cancers in Karachi. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 7, n. 2, p. 195–200, 2006.

BORTOLUZZI, M. C. et al. Assessment of p63 expression in oral squamous cell carcinomas and dysplasias. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 98, n. 6, p. 698–704, 2004.

BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Oral squamous cell carcinoma: Histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and

overall survival. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 29, n. 2, p. 167–178, 2005.

BROUSSARD, E. K.; MARY L. DISIS. TNM Staging in Colorectal Cancer: T Is for T Cellrand M Is for Mem. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 6, p. 2011–2013, 2011.

BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **The Journal of Pathology**, v. 166, n. 4, p. 375–381, 1992.

CANDI, E. et al. DeltaNp63 regulates thymic development through enhanced expression of FgfR2 and Jag2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 29, p. 11999–2004, 2007.

CHAKRABARTI, R. et al. Np63 promotes stem cell activity in mammary gland development and basal-like breast cancer by enhancing Fzd7 expression and Wnt signaling. **Nature cell biology**, p. 32, 2014.

CHEN, C.-C.; LIN, J.-C.; CHEN, K.-W. Lymph node ratio as a prognostic factor in head and neck cancer patients. **Radiation Oncology**, v. 10, n. 1, p. 181, 2015.

CHEN, Y. K.; HSUE, S. S.; LIN, L. M. Expression of p63 protein and mRNA in oral epithelial dysplasia. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 34, n. 4, p. 232–239, 2005.

COMPÉLAT, E. et al. p63 Gene Expression Study and Early Bladder Carcinogenesis. **Urology**, v. 70, n. 3, p. 459–462, 2007.

COSTA-PINHEIRO, P. et al. Diagnostic and prognostic epigenetic biomarkers in cancer. **Epigenomics**, v. 7, n. 6, p. 1003–1015, 2015.

COSTANZO, A. et al. TP63 and TP73 in cancer, an unresolved “family” puzzle of complexity, redundancy and hierarchy. **FEBS Letters**, v. 588, n. 16, p. 2590–2599, 2014.

DO, A. K. et al. Second Primary Tumors in Patients with Upper Aerodigestive Tract Cancers : Joint Effects of Smoking and Alcohol (United States). **Cancer Causes and**

**Control**, v. 14, n. 2, p. 131–138, 2003.

DOTTO, G. P. Crosstalk of Notch with p53 and p63 in cancer growth control. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 8, p. 587–595, 2009.

FANG, J. et al. Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 375, 2017.

FANG, Q.-G. et al. Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity in Ever Smokers: A Matched-Pair Analysis of Survival. **The Journal of craniofacial surgery**, v. 25, n. May, p. 934–937, 2014.

FELLER, L. L. et al. Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. **Cancer cell international**, v. 13, n. 1, p. 31, 2013.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide : Sources , methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, 2015.

FERRAIUOLO, M. et al. Oncogenic Intra-p53 Family Member Interactions in Human Cancers. **Frontiers in oncology**, v. 6, n. March, p. 77, 2016.

FLORES, E. R.; TSAI, K. Y.; CROWLEY, D. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. **Nature**, v. 416, n. April, p. 560–565, 2002.

FOSCHINI, M. P. et al. Pattern of p63 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, 2004.

GALON, J. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science**, v. 313, n. 5795, p. 1960–1964, 2006.

GILMORE, J. H. p63 steps into the limelight: crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis. **Nat Rev Cancer.**, v. 29, n. 10, p. 1883–1889, 2008.

GONFLONI, S.; CAPUTO, V.; IANNIZZOTTO, V. P63 in health and cancer. **International Journal of Developmental Biology**, v. 59, n. 1–3, p. 87–93, 2015.

GUARDAGNO, E. et al. Expression of p40 ( $\Delta$ Np63) protein in meningiomas, an unexpected finding. **Journal neural oncology**, 2016.

GUO, X.; MILLS, A. A. P63, Cellular Senescence and Tumor Development. **Cell Cycle**, v. 6, n. 3, p. 305–311, 2007.

GUPTA, N. et al. Changing Trends in oral cancer – a global scenario. **Nepal Journal of Epidemiology**, v. 6, n. 4, p. 613, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HINTZ, J. et al. Oral Squamous Cell Carcinoma From Users and Nonusers of Tobacco and Alcohol : Clinicopathologic Features and Immunoreactivity of VEGF, Caspase-3, and P53. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology**, v. 21, n. 2, p. 148–153, 2013.

HIRSCHOWITZ, L. et al. Standards and datasets for reporting cancers. **The Royal College of Pathologists**, v. G071, n. April 2011, p. 1–26, 2010.

IACONO, M. LO et al. P63 and P73 Isoform Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Corresponding Morphological Normal Lung Tissue. **Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer**, v. 6, n. 3, p. 473–481, 2011.

KIM, M. A. et al. In situ analysis of HER2 mRNA in gastric carcinoma: Comparison with fluorescence in situ hybridization, dual-color silver in situ hybridization, and immunohistochemistry. **Human Pathology**, v. 44, n. 4, p. 487–494, 2013.

KOGA, F. et al. Impaired p63 Expression Associates with Poor Prognosis and Uroplakin III Expression in Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. **Clinical cancer research**, v. 9, p. 5501–5507, 2003.

KOSTER, M. I. et al. P63 Induces Key Target Genes Required for Epidermal Morphogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3255–3260, 2007.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology**, v. 42, n. 10, p. 987–993, 2006.

- LAUXEN, I. S. et al. Immunoprofiling of oral squamous cell carcinomas reveals high p63 and survivin expression. **Oral diseases**, 2014.
- LI, C. et al. Oral Cancer Genetics and the Role of Precision. **Dental Clinics**, v. 62, p. 29–46, 2017.
- LO MUZIO, L. et al. p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. **Human Pathology**, 2005.
- LO MUZIO, L. et al. Effect of p63 expression on survival in oral squamous cell carcinoma. **Cancer investigation**, 2007.
- MARSH, D. et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. **Journal of Pathology**, v. 223, n. 4, p. 470–481, 2011.
- MELINO, G. p63 is a suppressor of tumorigenesis and metastasis interacting with mutant p53. **Cell death and differentiation**, 2011.
- MELINO, G. et al. Maintaining epithelial stemness with p63. **Science Signaling**, v. 8, n. 387, p. re9-re9, 2015.
- MEMMI, E. M. et al. p63 sustains self-renewal of mammary cancer stem cells through regulation of Sonic Hedgehog signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 11, p. 3499–3504, 2015.
- MLECNIK, B. et al. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 6, p. 610–618, 2011.
- MOERGEL, M. et al. Overexpression of p63 is associated with radiation resistance and prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, 2010.
- MUSCAT, J. E. et al. Gender differences in smoking and risk for oral cancer. **Cancer research**, v. 56, n. 22, p. 5192–5197, 1996.
- NEKULOVA, M. et al. Characterization of specific p63 and p63-N-terminal isoform antibodies and their application for immunohistochemistry. **Virchows Archiv**, v. 463, n. 3, p. 415–425, 2013.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 52, n. 4, p. 195–215, 2002.

NGUYEN, B. C. et al. Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. **Genes and Development**, v. 20, n. 8, p. 1028–1042, 2006.

NYLANDER, K. et al. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. **Journal of Pathology**, v. 198, n. 4, p. 417–427, 2002.

NYLANDER, K.; COATES, P. J.; HALL, P. A. Characterization of the expression pattern of p63 alpha and delta Np63 alpha in benign and malignant oral epithelial lesions. **International journal of cancer**, 2000.

OKADA, Y. et al. An analysis of cervical lymph nodes metastasis in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 32, n. 3, p. 284–288, 2003.

PARSA, R. et al. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. **The Journal of investigative dermatology**, v. 113, n. 6, p. 1099–1105, dez. 1999.

RAO, S. V. K. et al. Epidemiology of Oral Cancer in Asia in the Past Decade- An Update (2000-2012). **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 10, p. 5567–5577, 2013.

RAPISUWON, S.; VIETSCH, E. E.; WELLSTEIN, A. Circulating biomarkers to monitor cancer progression and treatment. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 14, p. 211–222, 2016.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 9, p. 11884–11894, 2015.

RIVERA, C.; VENEGAS, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). **Oncology Letters**, p. 7–11, 2014.

ROCCO, J. W. et al. P63 Mediates Survival in Squamous Cell Carcinoma By Suppression of P73-Dependent Apoptosis. **Cancer Cell**, v. 9, n. 1, p. 45–56, 2006.

SCHLIEPHAKE, H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer—A review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 32, n. 3, p. 233–245, 2003.

SCHNEIDER, I. J. C. et al. Survival rates of patients with cancer of the lip, mouth and pharynx: a cohort study of 10 years. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 3, p. 680–691, 2014.

SHAH ET AL. Current Concepts in Management of Oral Cancer – Surgery. **Oral Oncol**, v. 45, n. 0, p. 394–401, 2009.

SINHA, A. et al. Expression of p63 in potentially malignant and malignant oral lesions. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 5, n. 3, p. 165–172, 2015.

SOBIN, L.; PARKIN, D. M. International Classification of Diseases for Oncology. p. 240 pages, 2000.

SPEICHER, M. R. et al. Comparative Genomic Hybridization Detects Novel Deletions and Amplifications in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Michael. **Cancer Research**, p. 1010–1013, 1995.

SRIVASTAVA, K. et al. p63 drives invasion in keratinocytes expressing HPV16 E6/E7 genes through regulation of Src-FAK signalling. **Oncotarget**, 2015.

STACY, A. J. et al.  $\Delta$ Np63 $\alpha$  and microRNAs : leveraging the epithelial-mesenchymal transition. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 2114–2129, 2017.

SU, X. et al. TAp63 prevents premature aging by promoting adult stem cell maintenance. v. 5, n. 1, p. 64–75, 2012.

UCHIDA, K. et al.  $\Delta$ Np63 (p40) expression in prostatic adenocarcinoma with diffuse p63 positivity. **Human pathology**, v. 46, n. 3, p. 384–9, mar. 2015.

VEDAM, V. K. V.; BOAZ, K.; SRINATHARAJAN, K. Prognostic efficacy of nuclear morphometry at invasive front of oral squamous cell carcinoma: An image analysis microscopic study. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2014, 2014.

WEBER, A. et al. Expression of p53 and its homologues in primary and recurrent squamous cell carcinomas of the head and neck. **International Journal of Cancer**, v.



99, n. 1, p. 22–28, 2002.

WHO. IARC Working group on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans tobacco smoking. **WHO International agency for research of cancer Volume 38**, v. 38, p. 1–432, 1986.

WOLFF, K.-D.; FOLLMANN, M.; NAST, A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. **Deutsches Ärzteblatt international**, v. 109, n. 48, p. 829–35, 2012.

XU, M. et al. Ethanol disrupts vascular endothelial barrier: Implication in cancer metastasis. **Toxicological Sciences**, v. 127, n. 1, p. 42–53, 2012.


XU, M.; LUO, J. Alcohol and Cancer Stem Cells. **Cancers**, v. 9, n. 11, p. 158, 2017.

YAMAGUCHI, K. et al. Frequent gain of the p40/p51/p63 gene locus in primary head and neck squamous cell carcinoma. **International journal of cancer**, v. 86, n. 5, p. 684–9, 1 jun. 2000.

YOH, K.; PRYWES, R. Pathway Regulation of p63, a Director of Epithelial Cell Fate. **Frontiers in endocrinology**, v. 6, n. APR, p. 51, jan. 2015.

## 9. APÊNDICES

### APÊNDICE A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS  
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE  
Unimed Vitória

Vitória, 27 de junho de 2011.  
Projeto No: 318/2011  
Parecer: 21/2011 ☐ Inicial ☒ Conclusão

Titulo: **Estudo de Câncer de Cabeça e Pescoço no Brasil**  
Instituição: **Hospital Santa Rita de Cássia**  
Pesquisador: **José Roberto V de Podestá**  
Grupo e Área Temática Especial: **IA**

**Prezado Pesquisador**

Após o recebimento e apreciação do projeto e das respostas as pendências formuladas, seguem as observações deste Comitê:

1. Adequar os objetivos de acordo com hipóteses formuladas em linha com a justificativa do projeto.  
**Parecer do CEP:** pendência atendida
2. Incluir, na metodologia os critérios de seleção (inclusão e exclusão) amostral assim como características outras que sejam pertinentes. Explicitar, ainda na metodologia, o estudo piloto, e sua metodologia.  
**Parecer do CEP:** Pendência atendida. O estudo piloto não foi contemplado na metodologia, mas é citado na página 17.
3. Justificar ausência do cálculo amostral  
**Parecer do CEP:** Pendência atendida. É citado na página 10 (metodologia) que a amostra será de conveniência.
4. Adequar o TCLE à CNS 347/05 de Janeiro 2005 e incluir campos para identificação de quem aplicou o TCLE. É direito inalienável do sujeito de pesquisa saber ou não querer saber sobre seus resultados de exames realizados em sua propriedade biológica, tenha ou não aplicabilidade clínica. Pede-se, portanto, para rever a informação sobre o tema no TCLE.  
**Parecer do CEP:** pendência atendida. TCLE devidamente adequado e, sobe nossa avaliação, dentro dos critérios éticos e alinhados com a resolução 196/1996 e suas complementares.

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CIAS Unimed Vitória  
Av. Leitão da Silva, 2311, Bairro Itararé Vitória (ES) CEP: 29047-575 – 27 3335-5348 [cep@unimedvx.com.br](mailto:cep@unimedvx.com.br)

Página 1 de 2



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS  
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE  
Unimed Vitória

5. Corrigir o cronograma

**Parecer do CEP:** pendência atendida. Cronograma corrigido.

6. Incluir Declarações de Infraestrutura de todas as instituições hospitalares participantes, inclusive a do Hospital que assina a Folha de Rosto.

**Parecer do CEP:** pendência atendida. Declarações entregues.

7. Informar no dossiê se as amostras biológicas permanecerão identificadas e no país ou se serão exportadas e/ou desvinculadas dos respectivos sujeitos.

**Parecer do CEP:** pendência atendida

### CONCLUSÃO

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima citado, foi considerado:

### APROVADO

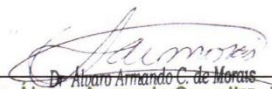
É parecer desse comitê que o referido projeto e demais documentos apresentados, **atende** aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Estamos aguardando o parecer final da CONEP.

Foram aprovados os seguintes documentos:

- Projeto de pesquisa versão de 1º de abril de 2011;
- Declaração de infraestrutura versão 27 de abril de 2011;
- Respostas as pendências versão 27 de abril de 2011;

O primeiro relatório de andamento do projeto deverá ser encaminhado a este CEP até o dia 27 de dezembro de 2011.

Atenciosamente,

  
Dr. Álvaro Armando Garvalho de Moraes  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em  
Seres Humanos do CIAS



## APÊNDICE B – PARECER DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE  
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER N°. 681/2011

**Registro CONEP 16525** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

**CAAE** – Não há CAAE ou nº de Folha de Rosto      **Processo nº** 25000.098091/2011-05  
**Projeto de Pesquisa:** *"Estudo de Câncer de cabeça e pescoço no Brasil"*. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de 10/04/2011.

**Pesquisador Responsável:** José Carlos de Oliveira

**Instituição:** ACCG/Instituto Ensino e Pesquisa/Hospital Araújo Jorge (**1º CENTRO BRASILEIRO**)

**CEP de origem:** CEP - ACCG - Instituto de Ensino e Pesquisa/GO

**Área Temática Especial:** Genética humana

**Patrocinador:** Não informado.

### Sumário geral do protocolo

O câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo de neoplasias que surgem na cavidade oral, faringe e laringe. É o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, representando cerca de 6% dos casos de câncer. Em todo o mundo, mais de 500.000 novos casos e 300.000 óbitos por câncer de cabeça e pescoço são estimados para ocorrer a cada ano. Este meio milhão de casos inclui 262.700 cânceres da cavidade oral, 117.200 cânceres de faringe e 169.600 cânceres da laringe. As taxas de incidência padronizadas são 15,3 e 4,5 por 100.000 homens e mulheres, respectivamente. As taxas de incidência no Brasil são cerca de 22,1/100.000 e 3,3/100.000 para homens e mulheres, respectivamente.

O tratamento primário varia de acordo com a localização anatômica e estágio da doença. Para a maioria dos tipos de câncer diagnosticados em estádios iniciais, a ressecção cirúrgica é a principal modalidade de tratamento. No entanto, para certos sítios anatômicos, como as amígdalas, a base da língua e o assoalho da boca, bem como para todos os cânceres localmente avançados, radioterapia é usada, isolada ou combinada com cirurgia. A quimioterapia pode ser utilizada em associação com a radioterapia. No entanto, no Brasil, a taxa de sobrevida em 5 anos ainda é inferior a 50%.

Publicações recentes sugerem um papel para infecção por HPV na sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (ver abaixo seção sobre HPV). Os Polimorfismos genéticos nos genes de reparo do DNA, os genes do ciclo celular, o metabolismo carcinogênico, e vias de genes do fator de crescimento foram analisados em relação à progressão e sobrevida de pacientes com câncer de vias aerodigestivas superiores (VADS). Polimorfismos nos genes XRCC1, FGFR e CCND1 foram associados com a sobrevida em pacientes com cânceres das VADS em pelo menos 2 estudos. No entanto, Hopkins *et al* criticou que esses estudos eram pequenos (<300 casos), muitas vezes tinham descrições inadequadas da população em estudo, não consideraram as comparações múltiplas de forma apropriada e podiam estar sujeitos a viés de publicação. Assim, não existem no momento estudos de seguimento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, que permitam a avaliação simultânea do papel do fumo, álcool, HPV, genética e tratamento

Cont. Parecer CONEP nº. 681/2011

**Situação: Protocolo aprovado com recomendação.**

**OBS:** No Brasil, além do centro em tela, está prevista a participação dos seguintes centros: Hospital do Câncer de Barretos/SP (Dr. André Lopes Carvalho/CEP do Hospital Câncer Barretos); Hospital Erasto Gaertner/PR (Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos e Dra. Paola Pedruzzi/CEP do Hospital Erasto Gaertner); Hospital A C Camargo/SP (Dr. Luiz Paulo Kowalski e Dr. Mauro Kasuo Ikeda/CEP do Hospital do Câncer - A C Camargo/SP); Associação de Combate ao Câncer em Goiás/Hospital Araújo Jorge/GO (Dr. José Carlos de Oliveira e Drª. Maria Paula Curado/Comitê de Ética do Hospital Araújo); Departamento de Otorrinolaringologia UFGO Goiânia/GO (Dr. Claudinei Cândido Costa/CEP do HC da UFG); Faculdade de Medicina do ABC/SP (Dra. Jossi Ledo Kanda/CEP NÃO INFORMADO); Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer/RN (Dr. Ricardo José Curioso da Silva e Dr. Luis Eduardo Barbalho de Melo /CEP da Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer); Instituto do Câncer do Ceará/CE (Dr. Eric Fernandes de Souza/CEP NÃO INFORMADO); FCECON - Fundação Centro Controle de Oncologia/AM (Dr. Marco Antonio Cruz Rocha e Dr. Jefferson Moreira de Medeiros/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Heliópolis/SP (Dr. Carlos Neutzling Lehn/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Santa Rita/AFECC - Associação Feminina de Educação e Combate ao Câncer/ES (Dr. Jose Roberto Vasconcelos de Podesta/Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS); Pontifícia Universidade Católica de Campinas/SP (Dr. José Francisco de Sales Chagas e Dr. Maria Beatriz Nogueira Pascoal/CEP da PUC Campinas); Hospital Universitário/UnB (Dr. Luiz Augusto Nascimento e Dr. Juliano de Padua Nakashima/Comitê de ética em Pesquisa - Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde); Instituto Nacional do Câncer – INCA/RJ (Dr. Fernando Luiz Dias, Dr. Roberto Araujo Lima e Dra. Isabella Costa Santos/Comitê de Ética e Pesquisa do INCA); Instituto Brasileiro de Controle do Câncer/SP (Dra. Adriana Sonderman, Dr. André Bandiera de Oliveira Santos e Dr. Fabio Roberto Pinto/CEP do BCC - Instituto Brasileiro de Controle do Câncer); Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP/SP (Dr. Lenine Garcia Brandão/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Amaral Carvalho FUNDAÇÃO AMARAL CARVALHO/SP (José Getulio Segalla/Comitê de Ética em Pesquisa Fundação Hospital Amaral Carvalho) e Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP/SP (Prof. Dr. Marcos B. Paiva/Comitê de Ética em Pesquisa).

Caso ocorra modificação nessa informação, o CEP do 1º Centro deve ser informado para comunicação à CONEP. O CEP deve enviar cópia dessa comunicação para o pesquisador responsável do seu Centro. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise do projeto.

**NOTA:** Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.5, VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 196/96 e item IV.1.m da Resolução CNS nº 251/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde:

- 1) formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à "Instituição de Pesquisa";
- 2) descrição da infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa;
- 3) vínculos do pesquisador;
- 4) anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas;

Ressalta-se que, havendo envolvimento do SUS em parcerias com instituições privadas, a avaliação desse aspecto extrapola as atribuições do Sistema CEPs-CONEP, devendo o pesquisador e o responsável pela instituição buscar a manifestação do Poder Público Correlato (estadual ou municipal), por meio da respectiva Assessoria Jurídica, em cumprimento à Lei Orgânica da Saúde 8080/91.

Brasília, 25 de outubro de 2011.



## APÊNDICE C – PARECER DO NATIONAL RESEARCH ETHICS SERVICE



### National Research Ethics Service

#### Coventry Research Ethics Committee

2nd floor West Wing  
University Hospital  
Clifford Bridge Road  
Coventry  
CV2 2DX

24 February 2010

Telephone: 024 7696 7529  
Facsimile: 024 7696 5033

Professor Hisham Mehanna  
Institute of Head & Neck Studies & Education  
University Hospital  
3<sup>rd</sup> floor opposite Ward 32  
Clifford Bridge Road  
Coventry CV2 2DX

Dear Professor Mehanna

**Study Title:** Improving treatment selection using Predictive Classifiers of Treatment Response for Head and Neck Cancers and dysplasia.  
**REC reference number:** 10/H1210/9  
**Protocol number:** Version 1.0

The Research Ethics Committee reviewed the above application at the meeting held on 16 February 2010. Thank you for attending to discuss the study.

#### Ethical opinion

You advised the Committee you were aiming to develop treatment response classification to help predict response to treatment for two types of patients; first patients who have laryngeal voice box or mouth and throat cancer; second patients with laryngeal and mouth dysplasia. Through using the formula you would be able to predict whether a patient with cancer with these characteristics would be best receiving surgery rather than chemotherapy similarly whether patients with oral dysplasia would better respond to surgery rather than a 'wait and see' approach thus individualising treatment for those patients. By linking a series of chemotherapy and genetic tests on the samples and responses to treatment in relevant cohort of patients you have target diseases or cancers by correlating biomarkers. This was a well known protocol for developing biomarkers and classifications in UK, i.e. biomarker road map.

According to the pilot study out of 100 patients 80 could not now be traced so the Committee wanted to know how you would know how the patients had progressed if you could not contact 80%. You explained that patients had been treated and biopsied in the local hospital then followed up, some died some didn't and you would follow up the local ones. You would ask the local team for patients' tissue and pseudo anonymised outcome data; i.e. link anonymised you had no way of tracking the code.

The local centres were responsible for consenting patients via the operating consent form so the Committee wondered if there was a possibility of tissue from someone who did not consent being included in the study. You stated that where there was agreement they would be included but before September 2006 patients' samples could be used without their express consent provided they were anonymised. Under

This Research Ethics Committee is an advisory committee to West Midlands Strategic Health Authority

*The National Research Ethics Service (NRES) represents the NRES Directorate within the National Patient Safety Agency and Research Ethics Committees in England*

### Statement of compliance

The Committee is constituted in accordance with the Governance Arrangements for Research Ethics Committees (July 2001) and complies fully with the Standard Operating Procedures for Research Ethics Committees in the UK.

### After ethical review

Now that you have completed the application process please visit the National Research Ethics Service website > After Review

You are invited to give your view of the service that you have received from the National Research Ethics Service and the application procedure. If you wish to make your views known please use the feedback form available on the website.

The attached document "After ethical review – guidance for researchers" gives detailed guidance on reporting requirements for studies with a favourable opinion, including:

- Notifying substantial amendments
- Adding new sites and investigators
- Progress and safety reports
- Notifying the end of the study

The NRES website also provides guidance on these topics, which is updated in the light of changes in reporting requirements or procedures.

We would also like to inform you that we consult regularly with stakeholders to improve our service. If you would like to join our Reference Group please email [referencegroup@nres.npsa.nhs.uk](mailto:referencegroup@nres.npsa.nhs.uk).

**10/H1210/9**

**Please quote this number on all correspondence**

With the Committee's best wishes for the success of this project

Yours sincerely



**Mr Stephen Keay**  
**Chairman**

Email: [pauline.pittaway@uhcw.nhs.uk](mailto:pauline.pittaway@uhcw.nhs.uk)

*Enclosures: List of names and professions of members who were present at the meeting and those who submitted written comments*

*"After ethical review – guidance for researchers SL-AR2"*

*Copy to: Mrs Ceri Jones, R&D, UHC&W NHS Trust*

## APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO INICIAL SOBRE HÁBITOS E ESTILO DE VIDA

ID No. BR VIX -

### ESTUDO INTERNACIONAL SOBRE CÂNCER DE BOCA, FARINGE E LARINGE ANEXO 1A

#### Questionário Inicial sobre Hábitos e Estilo de Vida

- A1 Status  
(1) Caso; (2) Controle
- Prontuário médico No (MV)..... Médico.....
- A3 Hospital .....
- A4 Entrevistador .....
- A5 Data da entrevista        
Dia Mês Ano
- A6 Nome Paciente: .....
- A7 RG:.....
- A8 Endereço: .....
- A9 Telefone fixo:..... Telefones adicionais:.....
- A10 Nome da mãe: .....
- A11 Qual a sua data de nascimento?        
Dia Mês Ano
- A12 Sexo  
(1) Masculino (2) Feminino
- A13 Qual a sua idade?
- A14 Qual a sua raça (cor da pele)?   
(1) Branco (2) Negro (3) Pardo ou Mulato (4) Amarelo (Asiático) (5) Indígena
- A15 Em que Município ou distrito você mora? .....
- A15 Em que Estado você mora? .....
- A16 Há quantos anos você vive nesse lugar?  
(se há menos de um ano, codifique como 00)
- A17 Se você mora nesse lugar há menos de um ano, em que Município você morava antes? .....
- A19 Qual o seu grau de escolaridade?   
(0) Analfabeto  
(1) Ensino Fundamental Incompleto  
(2) Ensino Fundamental Completo (concluiu a 8ª série)  
(3) Ensino Médio Completo (concluiu o 3º colegial)  
(4) Ensino Superior Completo
- A20 Você já teve diagnóstico de câncer no passado?   
(1) Sim (2) Não
- Se Sim. Qual foi o tipo de câncer (o local principal)? .....
- Aproximadamente, quando foi diagnosticado o câncer anterior?      
Mês Ano



ID No. BR VIX - **HÁBITO DE FUMAR**

- B1 Você fuma ou já fumou em média um cigarro/cachimbo regularmente, durante pelo menos 1 ano?   
 (1) Sim, ainda (2) Somente no passado (3) Não, nunca [se 'Não, nunca', vá para a questão C]

Se Sim ou somente no passado,

- B2 Normalmente, quantos cigarros/por dia, você fuma ou fumava?

- B3 Idade em que começou a fumar (isto é, fumando na maioria dos dias)

Somente para ex-fumantes

- B4 Idade em que parou de fumar

- B5 Você parou de fumar porque estava doente?   
 (1) Sim (2) Não

**CONSUMO DE BEBIDAS**

- C1 Você ingere ou já ingeriu bebidas alcoólicas regularmente, durante pelo menos 1 ano?   
 (1) Sim, ainda (2) Somente no passado (3) Não, nunca [se 'Não, nunca', vá para a questão D]

- C2 Quantas vezes por semana você consome ou consumia bebidas alcoólicas?   
 0 - 7 (0 significa nenhuma vez na maioria das semanas)

Para as pessoas que consomem bebidas alcoólicas atualmente ou já consumiram no passado.  
 O quanto normalmente você bebe ou costumava beber em uma semana?

Nota: Se o entrevistado responder em um intervalo (exemplo: de 2 a 3 garrafas), usar a maior quantidade (exemplo: 3 garrafas)

- C3 Cachaça ou outros destilados (vodca, uísque, tequila, rum, gim)  
 doses/semana ou  garrafas/semana

- C4 Vinho  
 taças/semana ou  garrafas/semana

- C5 Cerveja  
 latas/semana ou  garrafas/semana

- C6 Há quantos anos parou de beber?

- C7 Você parou de beber porque estava doente?   
 (1) Sim (2) Não

ID No. BR VIX - **SAÚDE BUCAL**

- D1 Com qual frequência você escova seus dentes?
- (0) Nunca  
 (1) < uma vez por semana (5) 2 vezes/dia  
 (2) 1-2 vezes por semana (6) 3 vezes/dia  
 (3) Dia sim, dia não (7) > 3 vezes/dia  
 (4) Uma vez por dia (8) Edêntulo (não tem dentes)

- D2 Você usa próteses removíveis ("dentadura", "ponte móvel")?
- (1) Sim, prótese total (dentadura) (2) Sim, prótese parcial (2) Não

Se sim:

- D4 Com qual idade você começou a usar próteses removíveis?

- D5 Nos últimos 20 anos, com qual frequência você foi ao dentista?
- (1) Todos os anos (3) A cada 5 anos ou mais  
 (2) A cada 2-5 anos (4) Nunca

- D6 Recebeu orientação do Dentista de como tratar a saúde bucal?
- (1) Sim (2) Não

- D7\* Recebeu tratamento odontológico do SUS ou da Rede Privada?
- (1) SUS (2) Privado

- D8\* Você percebeu alguma lesão na cavidade bucal?
- (1) Sim (2) Não

Se sim:

- D9 Há quanto tempo percebeu sinais e sintomas? (em meses)

## APÊNDICE E – FORMULÁRIO DE DADOS CLÍNICOS

ID No. BR VIX - |\_|\_|\_|\_|

### ANEXO 1B (Somente para os casos) FORMULÁRIO DE DADOS CLÍNICOS

**Orientações: Somente para Primeira Consulta. Este formulário deverá ser preenchido pelo médico.**

B1- Tratamento secundário será preenchido nos formulários de acompanhamento.

B2 - Data do preenchimento

|\_|\_|-|\_|\_|-|\_|\_|  
Dia Mês Ano

Nome Paciente: \_\_\_\_\_

#### 1. Dados de Referência, quando apropriado (DD/MM/AAAA):

- B3 - Biópsia |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|
- B4 - Diagnóstico clínico (consulta na oncologia) |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|
- B5- Diagnóstico patológico (laudo histopatológico) |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|

#### 2. DADOS PATOLÓGICOS

B6- Nome laboratório de Patologia ..... B7 - Laudo nº .....

B8 - Categoria do tipo histológico:

(1) Carcinoma epidermóide (2) Adenocarcinoma (3) Carcinoma in situ (displasia de alto grau)

(3) Outro (especificar): .....

B9 - Conclusão do laudo histopatológico (copiar conclusão completa)

.....

#### 3. FORMULÁRIO DE ESTADIAMENTO (classificação TNM, 7ª edição):

B10 - Sítio primário do tumor (topografia), segundo a CID-O3, 2000<sup>1</sup>: C|\_|\_|.|\_|

B11 – Sítio primário do tumor

(1) Lábio (2) Cavidade oral (3) Orofaringe (4) Hipofaringe (5) Laringe |\_|

B12 - Lateralidade do tumor: (1) Esquerda (2) Direita (3) Bilateral |\_|

B13 -Tumor multifocal: (1) Sim (2) Não |\_|

B14 - Diâmetro máximo, maior ou único do tumor em centímetros: |\_|\_|\_|

Estadiamento clínico

B15 T |\_|\_|\_|

B16 N |\_|\_|\_|

B17 M |\_|\_|\_| B18 - Se M1, sítio(s) de metástase: |\_|\_|\_|\_|

B19 Estadio |\_|\_|\_|\_|

#### TRATAMENTO PROPOSTO

|\_|

(1) Cirurgia (2) Radioterapia (3) Quimioterapia (4) Cirurgia + Radioterapia (5) Cirurgia + Quimioterapia (6) Radioterapia + Quimioterapia (7) Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia

## APÊNDICE F – FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

ID No. BR VIX - |\_|\_|\_|\_|\_|

### ANEXO 4 (somente para os casos) FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO CLÍNICO

ID No. INT-|\_|\_|-|\_|\_|\_|\_|\_|

**Momento de acompanhamento para o resultado:**

- (1) 1ª visita de acompanhamento (F1) ☐
- (2) 2ª visita de acompanhamento (F2):
- (3) 30 meses de acompanhamento
- (4) 60 meses de acompanhamento
- (5) Situação médica identificada em outro contexto  
(Especificar: : .....)

Formulário preenchido em (DD/MM/AAAA): |\_|\_|/|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|, por (Nome): .....

Dia                      Mês                      Ano

**Fonte da informação** (marque todas que se aplicam):

- (1) Registro de Mortalidade e câncer ☐
- (2) Declaração de óbito
- (3) Contato com o paciente ou familiares do paciente
- (4) Consulta médica
- (5) Prontuários médicos
- (6) Outros, especificar: .....

**Estado vital:**

- (1) Vivo    (2) Óbito    (3) Perdido seguimento ☐

**Se Vivo:**

**Progressão do tumor:**

- (1) Em remissão completa    (2) Doença residual    (3) Doença Sistêmica (metástase em outro órgão)
- (4) Recidiva (5) Segundo tumor primário CID |\_\_\_\_\_|

Se recidiva: (1) Local    (2) Regional ☐

Data da recidiva

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Se óbito, causa do óbito:**

Causa primária do óbito: código CID-10:

|\_|\_|\_|\_|

Caso o CID não esteja disponível selecione uma das seguintes opções:

☐

- (1) Câncer de cabeça e pescoço
- (2) Outro câncer
- (3) Toxicidade do tratamento usado para câncer de cabeça e pescoço
- (4) Outros, especificar:
- (5) Desconhecido

Data de óbito

\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Se perdido seguimento:**

Última data conhecida por estar vivo (em caso de perdido de seguimento) \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Para todos os pacientes, tratamentos adicionais (segunda linha) após o tratamento inicial: ☐

Tratamento (assinale todos que se aplicam)	Data de início (dd/mm/aaaa)	Data de término (dd/mm/aaaa)
(1) Cirurgia		N/A
(2) Radioterapia		
(3) Quimioterapia		
(4) Cirurgia + Radioterapia		
(5) Cirurgia + Quimioterapia		
(6) Radioterapia + Quimioterapia		
(7) Cirurgia + Quimioterapia + Radioterapia		

Informações/comentários adicionais: